

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO FRANCISCO BENTO

**CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DA CASCA DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec:
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO DECOCTO E DE FRAÇÕES
POLISSACARÍDICAS EM CÉLULAS HeLa E MACRÓFAGOS**

Curitiba

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JOÃO FRANCISCO BENTO

**CARACTERIZAÇÃO DE POLISSACARÍDEOS E METABÓLITOS
SECUNDÁRIOS DA CASCA DE *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec:
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO DECOCTO E DE FRAÇÕES
POLISSACARÍDICAS EM CÉLULAS HeLa E MACRÓFAGOS**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial a obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Guilhermina Rodrigues Noletto

Curitiba

2013

TERMO DE APROVAÇÃO

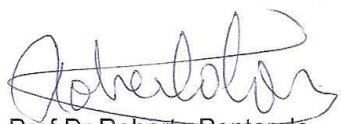
João Francisco Bento

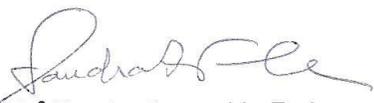
**Caracterização de Polissacarídeos e de metabólitos Secundários da
Casca de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec: Avaliação dos Efeitos do
Decocto e de frações polissacarídicas em Células HeLa e Macrófagos**


Profª Drª Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz (orientadora)
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR


Profª Drª Maria Eliane Merlin
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR


Prof Dr Luciano Campestrini
Faculdades Integradas do Brasil - UniBrasil


Prof Dr Roberto Pontarolo
Departamento de Farmácia - UFPR


Profª Drª Sandra Aparecida Furlan
Universidade Univille

Curitiba, 29 de novembro de 2013.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Carmen Lúcia de Oliveira Petkowicz, desde os tempos de mestrado, pela confiança e pelo apoio durante a realização dos experimentos e escrita da tese. Por sempre estar empregada com o progressos obtidos. À minha co-orientadora, Profa. Dra. Guilhermina Rodrigues Noletto, pela confiança em minha capacidade e por me estimular a sempre tentar o meu melhor. Ao Prof. Dr. Rudolf Bauer, da Karl Franzens Universitat, por aceitar um desconhecido brasileiro como orientado na Áustria, e pelo auxílio durante toda a minha estadia for a, tanto dentro do laboratório quanto fora dele. E aos demais professors que de alguma forma auxiliaram ou estimularam este trabalho.

À minha família: minha mãe, Maria, pela compreensão, por mais difícil que fosse para entender o significava fazer um doutorado e minha irmã, Raquel, minha salvação, só bastava um sorriso seu para o dia ficar mais alegre. Ao meu pai, Sérgio, *in memoriam*, que mesmo não tendo acompanhado presente toda esta jornada, ficaria muito contente, pois sempre foi alguém que estimulou e admirou o pensamento em todas as suas áreas e formas.

À minha família que a gente escolhe: os amigos. Os que caminham comigo desde muito tempo até os mais recentes: Karina, Andréia, Mariana, Luciana, Márcio, Gabriel, Shibuya, Nana, Marília, Ju Amorim, Monique, Simone, Livy, Patrícia, Edinara, Carol Naka. Isso só foi realizado com o suporte psicológico, fisiológico, filosófico de vocês.

À todos os colegas de laboratório que faziam o dia a dia mais agradável. Aos colegas do laboratório na Áustria: Nadine, Nadine Orto, Sabine, Omar e, em especial a querida Ruth, por todo o auxílio, carinho e amizade que me foram essenciais durante minha estadia fora. Te espero sempre aqui no Brasil. Aos amigos da época da biologia.

Ao indie rock, rock alternativo, folk rock, shoegaze, dream pop, synth pop e à MPB. Não consigo dar nome às bandas, mas tenham certeza, que esta tese só está no papel devido ao auxílio de vocês.

Aos que não conheço pessoalmente, mas gostaria que fossem meus amigos, pois, saibam, me fizeram mais feliz durante este período: Woody Allen, Almodóvar, Bertolucci, Agnes Varda, Techné, Truffaut, Wim Wenders, Kieslowski, Kurosawa, Kubrick, Coppola, entre tantos outros.

À todos que chegaram, aos que passaram, aos que ficaram em diferentes épocas e que contribuíram de alguma forma a minha formação, não somente à acadêmica, mas a da minha persona também.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências-Bioquímica, da Universidade Federal do Paraná e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa. Agradeço também ao Programa Ciência Sem Fronteiras pelo concessão da bolsa durante o período do doutorado "sanduíche". À CAPES e Fundação Araucária pelo formento de pesquisa.

“O pensamento é grande, rápido e livre: é a luz
do mundo e a glória maior do ser humano”

Bertrand Russel

“Tempo amigo seja legal
Conto contigo pela madrugada
Só me derrube no final”

Pato Fu

RESUMO

A espécie *Endopleura uchi* é nativa da região Amazônica e é utilizada na medicina popular na forma de decocto como antiinflamatório, contra infecções urinárias e miomas. Neste trabalho, o decocto e os polissacarídeos obtidos por precipitação etanólica foram avaliados quanto a seus efeitos sobre células HeLa e macrófagos peritoneais. Do decocto da casca do caule (UX), foi isolado um polissacarídeo bruto (AGb), a partir do qual, após processos de purificação, foi isolado uma arabinogalactana do tipo II (AG), cuja estrutura foi confirmada por análises químicas e espectroscópicas. Este polissacarídeo apresentou uma relação molar de Ara:Gal:Rha:GalA é de 2,6:3,2:0,9:1 e massa molar de $1,09 \times 10^5$ g/mol. As frações UX, AGb e AG foram utilizadas nos ensaios biológicos *in vitro* sobre as células HeLa e macrófagos peritoneais. UX diminuiu a viabilidade e proliferação celular de forma dose-dependente, atingindo reduções maiores que 50% na dose de 500 µg/ml. AGb e AG também tiveram este efeito, mas não de forma dose dependente e em torno de 20% de redução nas doses entre 25 e 500 µg/ml. UX na dose de 250 µg/ml promoveu aumento na população de células na fase sub-G1 de células marcadas com FITC-anexina e condensação da cromatina verificado por microscopia óptica. Além disso, UX aumentou a liberação de citocromo c. Estes dados sugerem que UX é capaz de promover a morte de células HeLa por apoptose através da via mitocondrial. AGb e AG não promoveram morte celular por apoptose. UX, AGb e AG não estimularam a liberação de óxido nítrico por macrófagos peritoneais nas doses de 25, 50 e 100 µg/ml. Entretanto, os tratamentos estimularam a liberação de ânions superóxido na presença e ausência de PMA. UX estimulou esta liberação de forma dose dependente, atingindo um aumento de 100% na dose de 100 µg/ml. Já AGb e AG também estimularam esta via, atingindo um estímulo de 30% na dose de 100 µg/ml. Macrófagos peritoneais quando tratados com UX, AGb e AG promoveram a ativação destas células evidenciado pela vacuolização do citoplasma e aumento das projeções citoplasmáticas. A investigação dos metabólitos secundários de *E. uchi* mostrou a extração de diversos compostos. Entre eles, a fração extraída com diclorometano a partir das cascas moídas apresentou grande citotoxicidade a células CCRF-CEM. Já o sobrenadante etanólico da precipitação do decocto de *E. uchi* também apresentou-se citotóxico a células CCRF-CEM. Esta amostra, quando fracionada por sílica gel, forneceu uma fração que fortemente diminuiu significativamente a viabilidade de células HeLa, indicando que nesta fração se encontra o composto ativo do decocto de *E. uchi*.

ABSTRACT

Endopleura uchi is a plant from the Amazon region and it is used in traditional medicine, as a decoction, as an antiinflammatory and against urinary infections and myomas. At this work, the decoction and the polysaccharides isolated from tea were evaluated for their effects at HeLa cells and peritoneal macrophages. From barks decoction (UX), it was isolated a crude polysaccharide (AGb), from which, through purification process, a type II arabinogalactan (AG) was isolated. The arabinogalactan structure was confirmed by chemical and spectrometric analysis. This polysaccharide had a molar relation of Ara:Gal:Rha:GalA from 2,6:3,2:0,9:1 and a molar mass of $1,09 \times 10^5$ g/mol. The fractions UX, AGb and AG were used for *in vitro* biological assays against HeLa cells and peritoneal macrophages. UX lowered HeLa cell viability and proliferation in a dose dependent manner, reaching inhibitions higher than 50% at 500 $\mu\text{g/ml}$. AGb and AG also had the same effect, although not in a dependent manner and the effect was approximately of 20% at doses varying from 25 to 500 $\mu\text{g/ml}$. UX at 250 $\mu\text{g/ml}$ increased HeLa cell population percentage at sub-G1 cell cycle phase, FITC-anexin cells and chromatin condensation verified by optical microscopy. Besides that, UX increased cytochrome c release. Taken together, these data suggest that UX may induce apoptosis of HeLa cells through the mitochondrial pathway. AGb and AG did not promote cell death through apoptosis. UX, AGb and AG did not stimulate nitric oxide release by peritoneal macrophages at concentrations of 25, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$. On the other hand, the treatments stimulated superoxide anions release at presence and absence of PMA. UX stimulated this release in a dose dependent manner, reaching an increase of 100% at 100 $\mu\text{g/ml}$. AGb and AG also stimulated this pathway, reaching an increase at this stimulus of 30% at 100 $\mu\text{g/ml}$. Peritoneal macrophage when treated with UX, AGb and AG, promoted the activation of these cells as seen by cytoplasm vacuolization and increased cytoplasm projections. These data suggest that these treatments might act as biological response modifiers. *E. uchi* secondary metabolites investigation revealed the a great extraction of compounds. The fraction obtained by dichloromethane had cytotoxicity against CCRF-CEM cells. The ethanolic supernatant of the decoction precipitation of *E. uchi* barks also was cytotoxic against CCRF-CEM cells. This sample, when fractionated by silica gel, furnished a fraction that greatly inhibited the viability of HeLa cells, indicating that at this fraction the active compound of *E. uchi* decoction is found.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULAS VEGETAIS ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR.....	23
FIGURA 2	MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II.....	25
FIGURA 3	REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICAS DAS ARABINOGALACTANAS DO TIPO I E II.....	27
FIGURA 4	GERAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS PELA ATIVAÇÃO DE OUTRAS ENZIMAS DO BURST OXIDATIVO.....	34
FIGURA 5	ESQUEMA ILUSTRANDO A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO [•]).....	36
FIGURA 6	RELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE MORTE CELULAR E DOENÇAS HUMANAS.....	38
FIGURA 7	VIAS INTRINSECA E EXTRINSECA DA APTOSE.....	40
FIGURA 8	VIAS DE SÍNTESE, DEGRADAÇÃO E INTERCONVERSÃO DAS MOLÉCULAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO.....	42
FIGURA 9	(A) ASPECTO GERAL, (B) INFLORESCÊNCIAS E (C) FRUTOS DE <i>E. UCHI</i> (UXI).....	44
FIGURA 10	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DO POLISSACARÍDEO BRUTO (AGb) OBTIDO DO DECOCTO DAS CASCAS DO CAULE DE <i>E. uchi</i>	69
FIGURA 11	FLUXOGRAMA DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR DECOCCÃO DAS CASCAS DO CAULE DE <i>E. uchi</i>	69
FIGURA 12	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC PARA AS FRAÇÕES (A) AGbS, (B) AGbP E (C) AGbSSf.....	71
FIGURA 13	PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC PARA A FRAÇÃO AG OBTIDA DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO.....	72
FIGURA 14	ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO AG.....	74
FIGURA 15	ESPECTRO DE RMN- ¹³ C DA FRAÇÃO AG.....	75
FIGURA 16	EFEITO DE UX, AGb E AG SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HeLa...	80
FIGURA 17	EFEITO DE UX, AGb E AG SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HeLa.....	82
FIGURA 18	HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DA ANÁLISE DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS HeLa TRATADAS COM UX, AGb e AG.....	86

FIGURA 19	PORCENTAGENS DE CÉLULAS HeLa EM CADA FASE DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM UX, AGb e AG.....	87
FIGURA 20	EFEITOS DO TRATAMENTO COM UX, AGb e AG SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS HeLa.....	89
FIGURA 21	DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DA AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR.....	91
FIGURA 22	PORCENTAGENS DE CÉLULAS HeLa VIAVÉIS E APOPTÓTICAS APÓS TRATAMENTO COM UX, AGb e AG	92
FIGURA 23	EFEITO DE UX, AGb e AG SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C EM CÉLULAS HeLa.....	94
FIGURA 24	VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM UX, AGb e AG POR 48 H.....	96
FIGURA 25	PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM UX, AGb e AG POR 2 H.....	98
FIGURA 26	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM UX, AGb e AG POR 48 H...	101
FIGURA 27	EFEITOS DO TRATAMENTO COM UX, AGb e AG SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	103
FIGURA 28	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES HEX, DMC, MeOH, H ₂ O E SUX UTILIZANDO SOLVENTE ACETATO DE ETILA:METANOL:ÁGUA.....	108
FIGURA 29	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES HEX, DMC, MeOH, H ₂ O E SUX UTILIZANDO SOLVENTE TOLUENO:ACETATO DE ETILA.....	109
FIGURA 30	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES HEX, DMC, MeOH, H ₂ O E SUX.....	110
FIGURA 31	VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CCRF-CEM TRATADO COM AS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DAS CASCAS DE <i>E. uchi</i>	111
FIGURA 32	FLUXOGRAMA DE FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS CASCAS DE <i>E. uchi</i>	112
FIGURA 33	VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CCRF-CEM TRATADO COM AS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO POR FASE SÓLIDA COM METANOL DA FRAÇÃO DCM.....	112
FIGURA 34	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELO FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ELUÍDAS COM ACETONITRILA A PARTIR DA FRAÇÃO DCM.....	114

FIGURA 35	VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CCRF-CEM TRATADO COM AS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO POR FASE SÓLIDA COM ACETONITRILA DA FRAÇÃO DCM.....	115
FIGURA 36	PERFIL DE ELUIÇÃO DA AMOSTRA SPE 90.....	116
FIGURA 37	PERFIL DE ELUIÇÃO DAS AMOSTRAS JB-UXI-1a, JB-UXI-6b, JB-UXI-7b, JB-UXI-9 E JB-UXI-10.....	117
FIGURA 38	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELO FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM SILICA GEL A PARTIR DA FRAÇÃO SUX.....	118
FIGURA 39	VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CCRF-CEM TRATADO COM AS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO POR SILICA EM GEL COM DA FRAÇÃO SUX.....	119
FIGURA 40	EFEITO DA FRAÇÃO 1A OBTIDA DO FRACIONAMENTO DA AMOSTRA SUX SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HeLa.....	120

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	REVELADORES UTILIZADOS NA INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NAS CASCAS DE <i>E. uchi</i>	53
TABELA 2	SOLVENTES UTILIZADOS NO FRACIONAMENTO DA AMOSTRA SUX.....	66
TABELA 3	RENDIMENTO, CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO DECOCTO DE <i>E. uchi</i>	70
TABELA 4	COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO AG E DA FRAÇÃO AG APÓS CARBOXI-REDUÇÃO (AGc).....	73
TABELA 5	ACETATO DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR METILAÇÃO DA AMOSTRA AG CARBOXI-REDUZIDA.....	77
TABELA 6	FRAÇÕES OBTIDAS PELO FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DA AMOSTRA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM DICLOROMETANO DAS CASCAS DE <i>E. uchi</i>	113

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	- Deslocamento químico
AG	- Polissacarídeo purificado obtido do decocto de <i>E. uchi</i>
AGb	- Polissacarídeo bruto obtido do decocto de <i>E. uchi</i>
AGbP	- Polissacarídeo insolúvel do fracionamento por congelamento/degelo de AGb
AGbS	- Polissacarídeo solúvel do fracionamento por congelamento/degelo de AGb
AGBSSf	- Polissacarídeo sobrenadante da precipitação por Fehling de AGbS
AGP	- Arabinogalactana proteína
Ara	- Arabinose
AU	- Ácido urônico
BRM	- Modificadores da resposta biológica
BSA	- Albumina de soro bovino
CO ₂	- Dióxido de carbono
D ₂ O	- Água deuterada
DCM	- Fração da extração das cascas do caule de <i>E. uchi</i> por diclorometano
Di	- Diâmetro interno
DMSO	- Dimetilsulfóxido
dn/dc	- Variação do índice de refração em relação à concentração
ED ₅₀	- Dose efetiva
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	- Isotiocianato de fluoresceína
Gal	- Galactose
Glc	- Glucose
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa
GLC-MS	- Cromatografia líquido-gasosa acoplada à espectrometria de massa
GM-CSF	- Fator estimulador de colônias granulócito de monocitós
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
H ₂ SO ₄	- Ácido Sulfúrico
HBSS	- Solução salina tamponada de Hank
HCl	- Ácido clorídrico

HEPES	- N-(2-hidroxietil) piperazina N'(ácido 2-etano sulfônico)
HEX	- Fração da extração das cascas do caule de <i>E. uchi</i> por hexano
HPLC	- Cromatografia líquida de alta eficiência
HPSEC	- Cromatografia de exclusão estérica de alta pressão
IFN- γ	- Interferon-gama
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível
KOH	- Hidróxido de potássio
LIF	- Fator inibidor de leucemia
LPS	- Lipopolissacarídeo
MALLS	- Espalhamento de luz laser em multiângulos
Man	- Manose
MCP	- Proteína quimiotática de monócitos
MEM	- Meio essencial mínimo de Eagle
MIF	- Fator de inibição e migração de macrófagos
MIP	- Proteína inflamatória de macrófagos
MOP	- Mieloperoxidase
MTT	- (3-[4,5dimethylthiazol-2]-2,5-diphenyltetrazolium bromide); azul de tetrazólio
M_w	- Massa molar ponderal média
NaBH ₄	- Boroidreto de sódio
NaBD ₄	- Borodeutério de sódio
NADH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NaNO ₂	- Nitrito de sódio
NaN ₃	- Azida de sódio
NaOH	- Hidróxido de sódio
NO•	- Óxido nítrico
O ₂ •-	- Ânion superóxido
PBS	- Solução salina tamponada
PI	- Iodeto de propídio
PMA	- Forbol 12-miristato, 13-acetato
ppm	- Partes por milhão
PVDF	- Fluoreto de polivinilideno

Rha	- Ramnose
RI	- Índice de refração
RPMI	- Meio Rosewell Park Memorial Institute
RMN- ¹³ C	- Ressonância magnética nuclear de carbono treze
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
SFB	- Soro fetal bovino
SOD	- Superóxido dismutase
SPE	- Extração por fase sólida
SUX	- Fração sobrenadante da precipitação etanólica do decocto de <i>E. uchi</i>
TFA	- Ácido Trifluoracético
TGF- β	- Fator de transformação de crescimento beta
TLC	- Cromatografia em camada delgada
TNF- α	- Fator de necrose tumoral alfa
TNFR	- Receptor para TNF
UV	- Ultravioleta
UX	- Decocto das cascas do caule de <i>E. uchi</i>
XTT	- (2,3-Bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetazólio-5-carboxanilida)
Xyl	- Xilose

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1 OBJETIVO GERAL	20
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL.....	22
2.2 ARABINOGALACTANAS.....	25
2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSCARÍDEOS DE FONTES VEGETAIS.....	28
2.3.1 Atividade biológica de arabinogalactanas.....	28
2.4 MACRÓFAGOS.....	31
2.4.1 <i>Burst</i> respiratório.....	33
2.4.2 Óxido nítrico.....	35
2.4.3 Ativação de macrófagos e atividade antitumoral.....	36
2.5 MORTE CELULAR.....	37
2.6 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	41
2.7 <i>Endopleura uchi</i> (UXI).....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS	46
3.1 MATERIAL DE ESTUDO.....	46
3.2 EXTRAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS POR DECOCCÃO DAS CASCAS DE <i>E. uchi</i>	46
3.3 ISOLAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA DECOCCÃO.....	46
3.4 PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR DECOCCÃO DAS CASCAS DE <i>E. uchi</i>	47
3.4.1 Fracionamento por congelamento/degelo.....	47
3.4.2 Precipitação por solução de Fehling.....	47

3.4.3 Fracionamento por ultrafiltração.....	48
3.5 ANÁLISE ESTRUTURAL DOS POLISSACARÍDEOS.....	48
3.5.1 Determinação da composição monossacarídica.....	48
3.5.2 Análise de metilação.....	49
3.5.3 Carboxi-redução.....	50
3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	50
3.6.1 Métodos cromatográficos.....	50
3.6.1.1 Cromatografia líquido-gasosa (GLC).....	50
3.6.1.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS).....	51
3.6.1.3 Determinação da homogeneidade e massa molar.....	51
3.6.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	52
3.6.1.5 Cromatografia em camada delgada (TLC).....	52
3.6.2 Métodos espectrométricos.....	53
3.6.2.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear.....	53
3.6.2.2 Espectrometria de infravermelho.....	54
3.7 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS.....	54
3.8 SOLUÇÕES E PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	55
3.8.1 Solução salina tamponada (PBS).....	55
3.8.2 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS).....	55
3.8.3 Solução de tripsina-EDTA.....	56
3.8.4 Meio de cultura.....	56
3.8.5 Linhagem celular.....	57
3.8.6 Solução da amostras.....	58
3.9 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	59
3.10 DETERMINAÇÃO DA CURVA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	60

3.11 ANÁLISE DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO.....	61
3.12 MORFOLOGIA CELULAR.....	61
3.13 MARCAÇÃO COM ANEXINA-V E IODETO DE PROPÍDIO.....	62
3.14 LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C.....	63
3.15 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	63
3.16 PRODUÇÃO DE ÂNIONS SUPERÓXIDO	64
3.17 FRACIONAMENTO BIOGUIADO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS..	65
3.17.1 Fracionamento em coluna silica gel.....	65
3.17.2 Fracionamento por extração em fase sólida (<i>solid phase extraction</i>)....	66
3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	67
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DO DECOCTO DE <i>E.uchi</i>	68
4.2 EFEITO DO DECOCTO E DOS POLISSACARÍDEOS DE <i>E. uchi</i> SOBRE CÉLULAS HeLa.....	79
4.2.1 Viabilidade celular.....	79
4.2.2 Proliferação celular.....	81
4.2.3 Análise de ciclo celular.....	84
4.2.4 Morfologia celular.....	88
4.2.5 Marcação com anexina V-FITC/PI.....	90
4.2.6 Liberação de citocromo c.....	93
4.3 EFEITO DO DECOCTO E DOS POLISSACARÍDEO DE <i>E. uchi</i> SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS.....	94
4.3.1 Viabilidade e morfologia celular.....	95
4.3.2 Produção de ânions superóxido ($O_2^{\bullet-}$).....	98
4.3.3 Produção de óxido nítrico (NO^{\bullet}).....	102
4.4 FRACIONAMENTO BIOGUIADO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS....	106
4.5 DISCUSSÃO FINAL.....	120

5. CONCLUSÃO.....	123
REFÊRENCIAS.....	124

1. INTRODUÇÃO

As plantas brasileiras são consideradas altamente promissoras para obtenção de novos fármacos e medicamentos à base de extratos vegetais, mas são pouco conhecidas sob qualquer ponto de vista. Além disso, produtos a base de plantas estão sendo consumidos sem que sua eficácia e segurança tenham sido suficientemente estudadas (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2001).

A utilização de plantas para o tratamento de enfermidades que acometem a espécie humana remonta à idade antiga. Inicialmente *in natura*, as plantas passaram a ser utilizadas na forma de chás, infusos ou decoctos, extratos e, por fim, como matéria prima para o isolamento de substâncias farmacologicamente ativas (CALIXTO, 2001).

Aproximadamente 25% dos medicamentos receitados nos países industrializados tem como origem as plantas. Além disso, aproximadamente 120 compostos de origem natural, obtidos a partir de cerca de 90 espécies de plantas, são utilizados na terapêutica moderna (HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

Nos últimos anos o uso de plantas medicinais aumentou na sociedade devido, principalmente, aos altos custos dos novos medicamentos estipulados pela indústria farmacêutica, além da busca por uma medicina mais natural (KLEIN *et al.*, 2009). Em países em desenvolvimento a medicina tradicional baseada nos conhecimentos populares possui papel central nos cuidados à saúde (CLARK, 1996). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que um terço da população global ainda não tem acesso a medicamentos essenciais e nas áreas mais pobres da África e Ásia, essa estimativa sobe para 50 % da população (WHO, 2002).

Os chás são a segunda bebida mais consumida no mundo, perdendo apenas para a água, e dentre os chás mundialmente consumidos destaca-se o da planta *Camellia sinensis*, mais conhecido como chá verde. Durante a preparação do

chá ocorre a extração de metabólitos secundários (principalmente compostos fenólicos e alcalóides) e metabólitos primários, como polissacarídeos. Muitas plantas utilizadas na medicina popular contêm polissacarídeos que possuem atividade biológica, como antioxidante (KARDASOVÁ; MACHOVÁ, 2006), anti-úlceras (CIPRIANI *et al.*, 2006), imunomodulatória (SCHEPETKIN *et al.*, 2005) e anti-tumoral (SAMPEDRO *et al.*, 2004).

Endopleura uchi (Huber) Cuatrec., pertencente à família Humiriaceae, é uma espécie originária da Amazônia. É popularmente conhecida por uxi, uchi ou uchi-pucu, sendo encontrada em mata de terra firme por toda a extensão da Bacia Amazônica (SCHULTES, 1979). O chá da casca da árvore é utilizado popularmente como antiinflamatório e também contra infecções urinárias e miomas (CORRÊA, 1984; REVILLA, 2001; RODRIGUES, 2007).

Apesar do grande potencial biológico, há poucos estudos envolvendo metabólitos primários e secundários presentes na casca do uxi, além de estudos que comprovem a eficácia do chá nos seus diversos usos populares. Sendo assim, este trabalho teve como enfoque isolar e caracterizar os polissacarídeos obtidos a partir da casca de *Endopleura uchi* e investigar os metabólitos secundários presentes nesta espécie. Além da caracterização química dos compostos da casca de *E. uchi*, o chá (decocto) e os polissacarídeos obtidos a partir do decocto foram avaliados quanto as suas propriedades citotóxicas em células tumorais de cérvix uterino humano (células HeLa) e propriedades imunomodulatórias em macrófagos peritoneais de camundongos.

1.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar polissacarídeos e metabólitos secundários das cascas de *Endopleura uchi* e avaliar a atividade do decocto e dos polissacarídeos sobre células HeLa e macrófagos peritoneais.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- extrair os polissacarídeos das cascas de *Endopleura uchi* por decocção;
- purificar e caracterizar os polissacarídeos obtidos;
- avaliar os efeitos *in vitro* do decocto de *Endopleura uchi* e dos polissacarídeos obtidos sobre células HeLa quanto à citotoxicidade e aspectos relacionados à morte celular, tais como: viabilidade e proliferação celular, morfologia celular, ciclo celular, liberação de citocromo *c* e avaliação por anexina V;
- avaliar os efeitos *in vitro* do decocto de *Endopleura uchi* e dos polissacarídeos obtidos sobre macrófagos peritoneais de camundongos quanto viabilidade celular, morfologia celular, produção de óxido nítrico (NO*) e ânion superóxido (O₂*);
- investigar a composição de metabólitos secundários das cascas de *Endopleura uchi*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PAREDE CELULAR VEGETAL

A parede celular vegetal é uma estrutura complexa formada por polissacarídeos, proteínas e compostos fenólicos (SOMERVILLE *et al.*, 2004). Ela confere resistência e forma para a célula, rigidez para a planta toda, controla o crescimento, participa na comunicação célula-célula e protege contra o ataque de patógenos e predadores (BRETT; WALDRON, 1990).

A parede celular primária é uma matriz flexível que se deposita durante a divisão celular e aumenta sua área de superfície durante a expansão da célula. Depois de cessado o crescimento da célula, internamente à parede primária pode se formar a parede secundária, que se caracteriza pela deposição do polímero fenólico lignina, que confere dureza à planta. Esse processo, chamado de lignificação, é seguido pela morte celular e pelo desaparecimento do conteúdo citoplasmático (REID, 1997).

A parede celular secundária é composta de camadas e a diferença entre estas camadas deve-se à distribuição dos polissacarídeos que as constituem. Entre as paredes primárias de células vizinhas encontra-se uma estrutura denominada lamela média, importante na adesão célula-célula (Figura 1) (CARPITA; Mc CANN, 2000; COSGROVE, 2005; KANEDA; RENSING; SAMUELS, 2010).

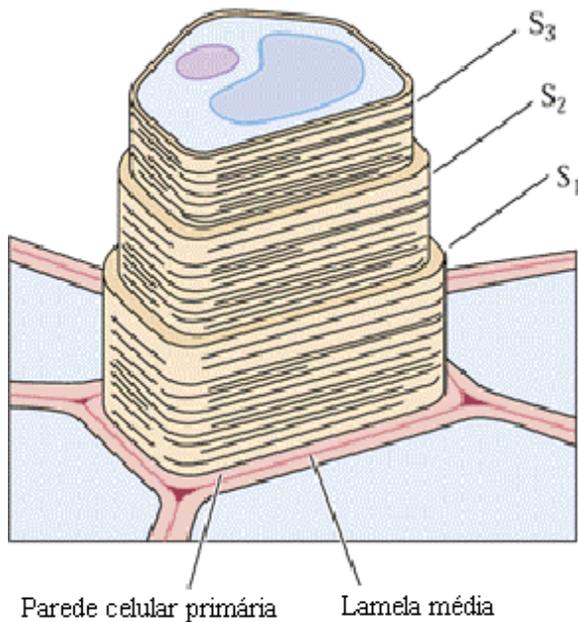


FIGURA 1 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CÉLULAS VEGETAIS ILUSTRANDO A DISPOSIÇÃO DA PAREDE CELULAR

FONTE: CARPITA; Mc CANN, 2000.

NOTA: Célula vegetal mostrando as diferentes camadas da parede celular secundária (S₁, S₂ e S₃), a parede celular primária e a lamela média entre as paredes primária de células adjacentes.

Os principais componentes da parede celular vegetal primária são polissacarídeos: celulose, hemiceluloses e pectinas. A composição da parede celular primária das dicotiledôneas é, tipicamente, 15-40% celulose, 15-25% hemicelulose, 15-40% pectinas e 5-10% proteínas. Já a parede celular secundária consiste de 40-45% de celulose, 15-35% de hemicelulose, 15-30% de lignina e quantidade mínimas de pectina (DEY *et al.*, 1997)

A celulose é um polímero formado por uma cadeia linear constituído por unidades de glucose ligadas β -(1 \rightarrow 4). As hemiceluloses são polissacarídeos que ocorrem em íntima associação com a celulose. São exemplos de hemiceluloses: xilanas, glucomananas, galactomananas, glucuronomananas, xiloglucanas e glucuronoarabinoxilanas (CARPITA; McCANN, 2000). As pectinas são polissacarídeos ricos em ácido galacturônico, ramnose e arabinose que incluem as homogalacturonanas (HG), ramnogalacturonanas-I (RG-I),

ramnogalacturonanas-II (RG-II), xilogalacturonanas (XGA) e apiogalacturonanas (MOHNEN, 2008).

Um dos modelos mais aceitos de parede celular primária foi elaborado por Carpita e Gibeaut (1993) que propuseram dois tipos de estrutura para as angiospermas, baseado nas diferenças na quantidade de polissacarídeos pécnicos e hemiceluloses. O primeiro modelo, chamado de parede do tipo I, inclui a parede das espécies de dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas (não comelinóides). A parede do tipo II corresponde à parede das Poaceae e engloba a maior parte das monocotiledôneas (comelinóides). Na Figura 2 esquematicamente tem-se os dois tipos de parede celular primária.

A parede primária do tipo I é composta por uma rede de fibras de celulose entrelaçadas com xiloglucanas, formando uma rede celulose-xiloglucana, a qual compreende 50% da parede celular. As xiloglucanas ligam-se firmemente as microfibrilas de celulose e são longas o suficiente para estender-se e ligar duas microfibrilas. Esta rede de celulose-xiloglucana está embebida por uma matriz de pectina (20-35%), a qual controla entre outras propriedades fisiológicas, a porosidade. Além disso, a parede primária do tipo I contém outros polissacarídeos hemicelulósicos em menor proporção e grande quantidade de proteínas estruturais, sendo a principal a extensina, a qual pode interagir com os polissacarídeos (CARPITA; McCANN, 2000; COSGROVE, 2005; LEROUXEL *et al.*, 2006; SANDHU; RANDHAWA; DHUGGA, 2009).

Na parede primária celular do tipo II as microfibrilas de celulose estão interligadas às glucuronoarabinoxilanas, as quais constituem a principal hemicelulose presente a parede celular do tipo II. Em geral, a parede primária do tipo II possui menor proporção de pectina (10%), porém o aumento da densidade de carga é proveniente das unidades de ácido glucurônico da hemicelulose. A quantidade de proteínas estruturais é menor na parede tipo II, entretanto, estas apresentam compostos fenólicos que participam na formação de ligações cruzadas entre os polissacarídeos (CARPITA; McCANN, 2000).

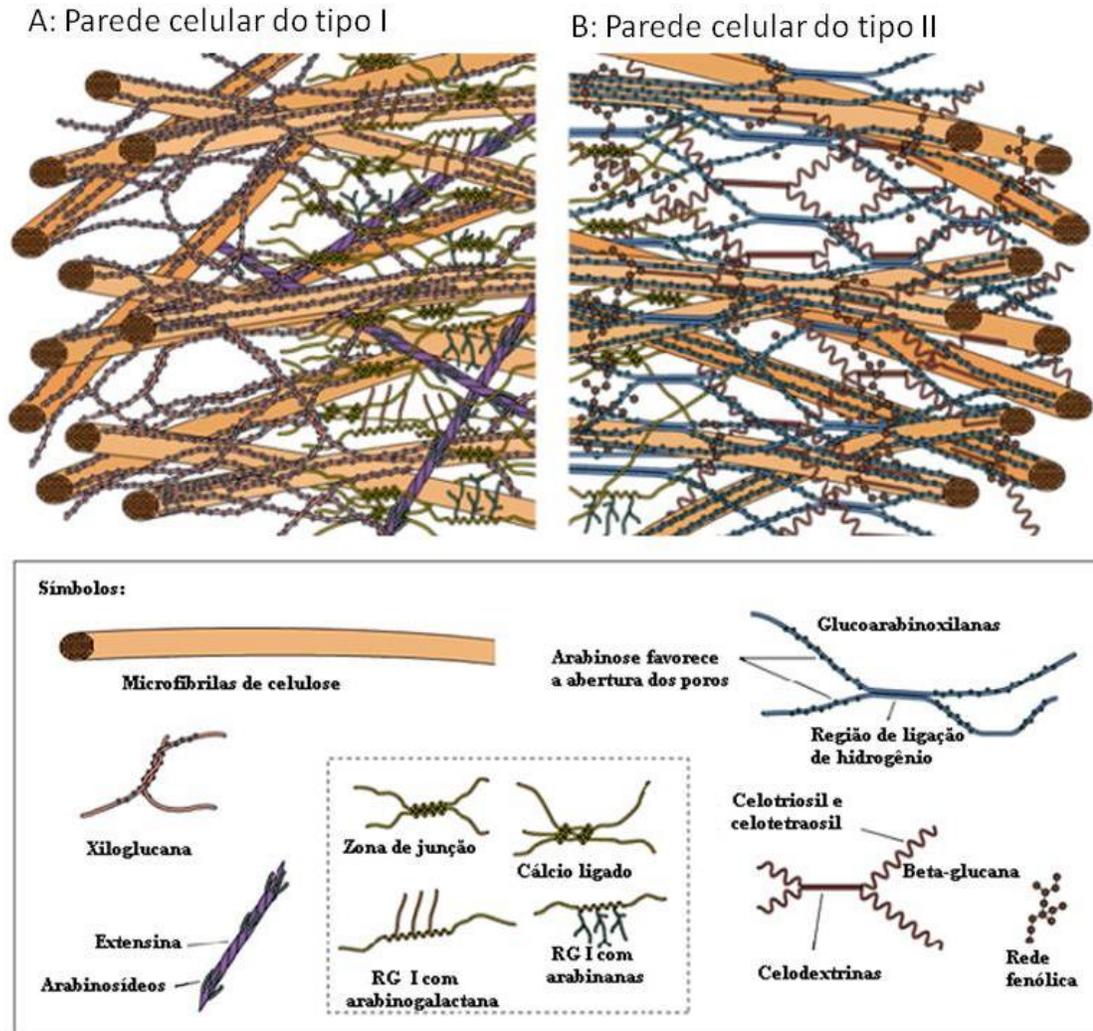


FIGURA 2 – MODELO DE PAREDE CELULAR PRIMÁRIA DO TIPO I E DO TIPO II
 FONTE: CARPITA; Mc CANN, 2000.

NOTA: A: Modelo tridimensional de parede celular primária do tipo I mostrando as interações moleculares entre celulose, xiloglucanas e pectinas. B: Modelo tridimensional da parede celular do tipo II, mostrando a interação molecular entre celulose, glucuronoarabinoxilanas, pectinas e substâncias aromáticas.

2.2 ARABINOGALACTANAS

Arabinogalactanas são polissacarídeos compostos majoritariamente de arabinose e galactose. Elas são encontradas em todo o reino vegetal, desde briófitas até angiospermas (LEE *et al.*, 2005). Elas já foram isoladas de diversos

órgãos vegetais como folhas, caules, flores (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983), além de gomas e exsudatos vegetais (DELGOBO *et al.*, 1999).

De acordo com as ligações presentes na cadeia principal, as arabinogalactanas podem ser divididas em dois grupos: arabinogalactanas do tipo I e arabinogalactanas do tipo II. As arabinogalactanas do tipo I (Figura 3) são compostas por unidades de D-galactopiranosose unidas por ligações β -(1 \rightarrow 4) substituídas por unidades de α -L-arabinofuranose (1 \rightarrow 5) geralmente ligadas no O-3 das galactoses. Elas são encontradas em frações pécticas associadas a ramnogalacturonanas I (CARPITA; McCANN, 2000).

As arabinogalactanas do tipo II (Figura 3) são formadas por cadeias curtas de (1 \rightarrow 3) (1 \rightarrow 6) β -galactanas conectadas umas as outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6. As cadeias laterais podem terminar com unidades de arabinose, fucose, ramnose e monossacarídeos ácidos, como ácido glucurônico, ácido 4-O-metil-glucurônico e ácido galacturônico (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983; STEPHEN, 1983). As arabinogalactanas do tipo II podem estar associadas a proteínas sendo denominadas de arabinogalactanas-proteínas (AGPs) (SHOWALTER, 1993).

Nas AGPs, a porção protéica geralmente varia entre 2 a 10% e contém grande quantidade de unidades de hidroxiprolina, a qual participa na ligação entre a porção protéica e glicídica. Outros aminoácidos, entretanto, podem desempenhar este papel, como a serina e a treonina (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983; JERMYN, 1980). As AGPs podem ser encontradas na parede celular e na membrana plasmática, além de serem secretadas em exsudatos. Células vegetais em suspensão também podem excretar arabinogalactanas no meio de cultivo (SHOWALTER, 1993; ELLIS *et al.*, 2010). As arabinogalactanas estão envolvidas no reconhecimento célula-célula, na regulação da expansão e da divisão celular e na morte celular programada (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983; SCHINDLER *et al.*, 1998).

As AGPs se ligam especificamente a um reagente denominado β -Glucosil Yariv, entretanto o mecanismo de ligação ainda é incerto. Este reagente é comumente utilizado para identificação, quantificação e purificação das AGPs

2.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE POLISSACARÍDEOS DE FONTES VEGETAIS

Nas últimas décadas, polissacarídeos de fontes botânicas vêm atraindo atenção na área de medicina devido às suas propriedades terapêuticas e baixa toxicidade. Os estudos visando identificar a atividade biológica de polissacarídeos utilizam diferentes classes destas moléculas, para as quais já foram caracterizadas diferentes efeitos como antiviral (TZIBANOS, 2000), antitumoral (SAMPEDRO *et al.*, 2004), antibacteriana (SRIVASTAVA; KULSHVESHTHA, 1989), anticoagulante (HAYASHI *et al.*, 1997), antiúlcera (CIPRIANI *et al.*, 2009) e imunomodulatória (MORETÃO *et al.*, 2004; SCHEPETKIN *et al.*, 2006). Compostos capazes de alterar alguma função do organismo, como por exemplo, aumentar e/ou prolongar a resposta imunológica são classificados como moduladores da resposta biológica (BRMs) e/ou imunomoduladores (BOHN; BeMILLER, 1995). Os BRMs podem ser moléculas produzidas endogenamente, como por exemplo, citocinas e de fontes exógenas, como compostos de bactérias, algas e plantas (TZIANABOS, 2000; LEUNG *et al.*, 2006).

Entre os polissacarídeos vegetais cujas atividades biológicas vêm sendo estudadas, destacamos as arabinogalactanas.

2.3.1 Atividade biológica de arabinogalactanas

Diversos estudos têm demonstrado que arabinogalactanas obtidas de diferentes fontes, contendo características químicas peculiares para cada espécie, são bioativas quando testadas *in vitro* e *in vivo* e podem ser responsáveis ou parcialmente responsáveis por atividades biológicas atribuídas a plantas (CIPRIANI *et al.*, 2006; ZIPPERL; DETERS; HANSEL, 2009).

Da planta *Mimosa tenuiflora*, utilizada popularmente para cicatrização de feridas, uma arabinogalactana proteína estimulou a proliferação *in vitro* de fibroblasto humanos na dose de 10 µg/ml, enquanto o extrato aquoso da planta diminuiu a proliferação destas células de maneira dose dependente. O aumento da taxa de proliferação de fibroblastos humanos sugere um impacto positivo deste carboidrato na regeneração da pele após lesões (ZIPPEL; DETERS; HENSEL, 2009). A arabinogalactana proteína de *Jatropha curcas* também pode atuar na cicatrização, além de induzir a proliferação de fibroblastos, já que o polissacarídeo estimulou a diferenciação de queratinócitos primários conforme demonstrado pela ativação de marcadores de diferenciação (ZIPPEL; WEELS; HENSEL, 2010).

Atividades anti-úlceras também foram descritas para arabinogalactanas. Cipriani *et al.* (2006; 2009) isolaram arabinogalactanas do tipo I e II, respectivamente, das plantas *Glicine max* e *Maytenus ilicifolia*. Ambas arabinogalactanas reduziram lesões gástricas induzidas por etanol em ratos e o ED₅₀ foi de 35 e 9,3 mg/kg para as arabinogalactanas de espinheira santa e soja, respectivamente.

Os efeitos biológicos mais estudados para as arabinogalactanas referem-se a sua atividade como molécula imunomodulatória. Moretão *et al.* (2003; 2004) observaram que a arabinogalactana isolado da goma da *Anadenanthera colubrina* (angico branco), denominada ARAGAL, promove a ativação de macrófagos peritoneais conforme observado pelo aumento na atividade fagocítica, na capacidade elicitora de macrófagos para a cavidade intraperitoneal e na produção de ânions superóxido e TNF-α. O polissacarídeo também diminuiu o crescimento do tumor S-180 *in vitro* e *in vivo*. Quando as células deste sarcoma foram incubadas com macrófagos pré-tratados com o polímero na dose de 10 a 200 µg/ml, as células S-180 foram fagocitadas pelos macrófagos ativados. Além disso, esta arabinogalactana diminuiu o tamanho do tumor S-180 em 38% quando administrada pela via intraperitoneal em ratos na dose de 100 mg/kg. O polissacarídeo ARAGAL apresentou atividade leishmanicida nas concentrações 10, 25 e 50 µg/mL, inibindo 88% do crescimento da *Leishmania amazonensis* na

concentração mais baixa. O efeito leishmanicida deste polímero pode ser atribuído ao estímulo na produção de ânions superóxido (MARCOLINO, 2010).

Outra arabinogalactana, obtida do chá de *Phyllanthus niruri* aumentou a produção de ânion superóxido em 3 vezes por macrófagos peritoneais de camundongo quando comparados ao controle. Após tratamento com HCl *in vitro*, mimetizando as condições ácidas estomacais, os fragmentos de alta e baixa massa molar originados foram capazes de aumentar a produção de ânions superóxido em 2 e 2,3, respectivamente, em relação ao controle, indicando uma possível relação entre massa molar e atividade biológica (MELLINGER *et al.*, 2008).

Três arabinogalactanas purificadas das raízes de *Baptista tinctoria* e *Echinaceae pallida* e da suspensão celular de *Echinacea purpurea* exibiram diferenças nas suas atividades de secreção de NO*, IL-6 e IgM. As arabinogalactanas isoladas das raízes estimularam a produção de óxido nítrico e interleucina-6 por macrófagos alveolares *in vitro* e a produção de IgM por linfócitos de camundongos, enquanto a arabinogalactana de *E. purpurea* apresentou baixa atividade. Os autores sugerem que a presença de unidades de arabinose ligadas (1→5) é importante para a atividade das arabinogalactanas, já que as arabinogalactanas de *B. tinctoria* e *E. pallida* contêm, de acordo com a análise de metilação, 8,7% e 13% de arabinose neste tipo de ligação, respectivamente, enquanto a de *E. purpurea* somente apresenta traços (CLASSEN *et al.*, 2006).

Arabinogalactanas proteínicas isoladas de *Viscum album*, *Plantago major* e *Mahonia aquifolium* foram capazes de modular o sistema complemento, que faz parte da resposta imune inata dos organismos (WAGNER; JORDAN, 1998; SAMUELSEN *et al.*, 1998; KARDOSOVÁ *et al.*, 2004)

Das raízes da espécie *Angelica gigas* foi isolado um polissacarídeo composto de Ara, Gal e ácidos urônicos chamado de angelana (HAN *et al.*, 1998). Este polímero aumentou a sobrevivência de ratos transfectados com células de melanoma B16F10 de 18 para 40 dias quando angelana foi administrada intraperitonealmente em uma dose de 30 mg/kg durante 19 dias a partir da implementação do tumor. Ainda neste contexto, uma arabinogalactana ácida

contendo Ara, Gal, GalA e Rha (5,5:1,4:1,1:1), extraída de *Angelica acutiloba* aumentou a sobrevivência de ratos portadores de tumores S-180 em 76% na mesma dose de 30 mg/kg (YAMADA *et al.*, 1990).

Ginsana, um polissacarídeo ácido, constituído de Ara, Gal, Glc e GalA, isolado de *Panax ginseng* (ginseng), apresenta atividade antitumoral, demonstrada pela indução de apoptose em linhagens de células leucêmicas (K562, HL-60 e KG1- α) (SONODA *et al.*, 1998; SONG *et al.*, 2002).

Uma arabinogalactana ácida isolada de *Centella asiatica* contendo Ara, Gal, Rha, GalA e Xyl na proporção de 1,0:1,9:0,26:0,3:0,15 apresentou atividade imunomodulatórias em linfócitos T e B estimulando a secreção de IFN- γ , IL-12 e IL-6 e inibindo a secreção de IL-10 (WANG *et al.*, 2005). Outra arabinogalactana ácida isolada de *Echinacea purpurea* (equinácia) estimulou a proliferação celular de macrófagos e apresentou atividade citotóxica para a linhagem tumoral WEHI 164, apresentando citotoxicidade de 25% em relação ao controle na dose de 250 μ g/ml (STIMPEL *et al.*, 1984; LUETTIG *et al.*, 1989).

2.4 MACRÓFAGOS

Macrófagos são células do sistema dos fagócitos mononucleares, chamados de monócitos no sangue e macrófagos nos tecidos. Estas células são amplamente distribuídas pelo corpo e localizam-se, principalmente, no baço, fígado (células de Kupffer), pulmão (macrófagos alveolares), nódulos linfóides e pele (células de Langerhans) (ADAMS, 1979; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Os macrófagos são responsáveis por inúmeros processos homeostáticos, imunológicos e inflamatórios, além de representarem a primeira linha de defesa do organismo. Os macrófagos fagocitam e destroem agentes patológicos como bactérias, vírus, fungos, protozoários e helmintos (HACKETT; 2003; ABBAS; LICHTMAN, 2005; FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Além dos patógenos, estas células reconhecem e fagocitam células mortas ou restos celulares de

células em processo de apoptose, além de células neoplásicas (KLIMP *et al.*, 2002; FAIRWEATHER; CIHAKOVA, 2009). Um importante papel do macrófago durante a resposta imune inata é produzir citocinas, as quais promovem o recrutamento e ativação de mais macrófagos e outras células inflamatórias (BEUTLER, 2004; COMMINS; BORISH; STEINKE, 2010). Na resposta imune adaptativa os macrófagos processam e apresentam os antígenos para os linfócitos, os quais por sua vez, tornam-se capazes de produzir anticorpos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Dependendo do estado funcional, os macrófagos podem ser classificados como: macrófagos residentes, que são derivados da cavidade peritoneal sem nenhum estímulo; macrófagos elicitados, que são recrutados para a cavidade peritoneal por um agente inflamatório não específico; e macrófagos ativados, que são recrutados para a cavidade peritoneal por um agente infeccioso e produzem um exudato rico em citocinas (COHN, 1978; CRAWFORD *et al.*, 1987).

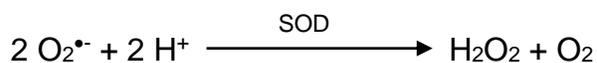
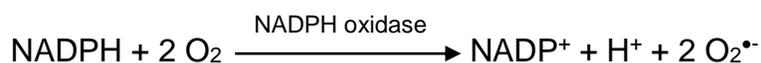
Guiado por um gradiente de moléculas quimiotáticas, o macrófago move-se em direção à partícula microbiana (BURKE; LEWIS, 2002). Inicia-se então o processo de fagocitose, que é mediado por receptores específicos expressos na superfície destas células. A habilidade destas células fagocíticas em reconhecer ligantes endógenos e exógenos e responderem apropriadamente é a função central dos macrófagos (TAYLOR *et al.*, 2005).

Em resposta à fagocitose ocorre a ativação do macrófago. O termo “macrófago ativado” geralmente refere-se a macrófagos cujas características funcionais, bioquímicas e morfológicas refletem um aumento da atividade celular. Quando comparados com macrófagos residentes, os macrófagos ativados são maiores e mais aderentes às superfícies. Uma vez ativados, os macrófagos podem então fagocitar bactérias, leveduras e células mortas. No intuito de destruir e eliminar os elementos fagocitados, bem como os invasores, estas células podem desencadear o *burst* respiratório, que se caracteriza pelo acentuado aumento no consumo de oxigênio e liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e produção de NO[•] pelo macrófago (KARNOVSKI; LAZDINS, 1978; NATHAN, 1985; FADOK *et al.*, 1993; MARCINKIEWICZ, 1997; HALLIWELL; GUTERIDGE, 1999).

Os macrófagos secretam moléculas sinalizadoras chamadas citocinas e quimiocinas, as quais dirigem a resposta imune (ABBAS; LICHTMAN, 2005). A capacidade dos macrófagos em produzir citocinas depende do grau de maturação, ativação e localização destas células (CAVAILLON, 1994). As citocinas são importantes porque permitem a comunicação entre células do sistema imune via receptores específicos presentes nas superfícies celulares. Vários componentes solúveis de bactérias, como endotoxinas, exotoxinas, enterotoxinas e peptidoglicanas, são capazes de induzir a produção de citocinas por macrófagos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

2.4.1 *Burst* respiratório

O *burst* oxidativo ou respiratório é um processo de proteção celular caracterizado pelo aumento rápido do consumo de oxigênio, gerado pela ativação da reação de redução do oxigênio a ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e, posteriormente, o $O_2^{\bullet-}$ é convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Esse processo é catalisado, inicialmente, por um complexo multienzimático, o qual é denominado de forma geral como NADPH oxidase (BABIOR, 1992; KLEBANOFF, 1992; ROTROSEN, 1992). As reações do *burst* respiratório estão mostradas a seguir:



A NADPH oxidase é constituída por componentes citosólicos e uma flavoproteína ligada à membrana de vesículas secretoras que, sob estímulo, fundem-se à membrana plasmática. A enzima encontra-se inativa em macrófagos

não ativados, no entanto, quando as células são estimuladas por agentes apropriados, a NADPH oxidase torna-se rapidamente ativa e ocorre a translocação de proteínas fosforiladas para a membrana, onde se associam ao citocromo b558, tornando a enzima ativa e, portanto, capaz de realizar a reação de oxidação do oxigênio (BEUTLER, 2004).

Os produtos obtidos do *burst* respiratório, como o $O_2^{\bullet-}$ e o H_2O_2 , são considerados espécies reativas de oxigênio de baixa reatividade, e servem de substratos para geração de outras espécies mais reativas, como radical hidroxila (via reação de Fenton, catalizada por ferro) ou halogênios reativos (ácido hipocloroso, hipoclorito gerando oxigênio singlete), capazes de destruir os patógenos fagocitados ou presentes no meio extracelular, conforme Figura 4 (BEUTLER, 2004) (Figura 5).

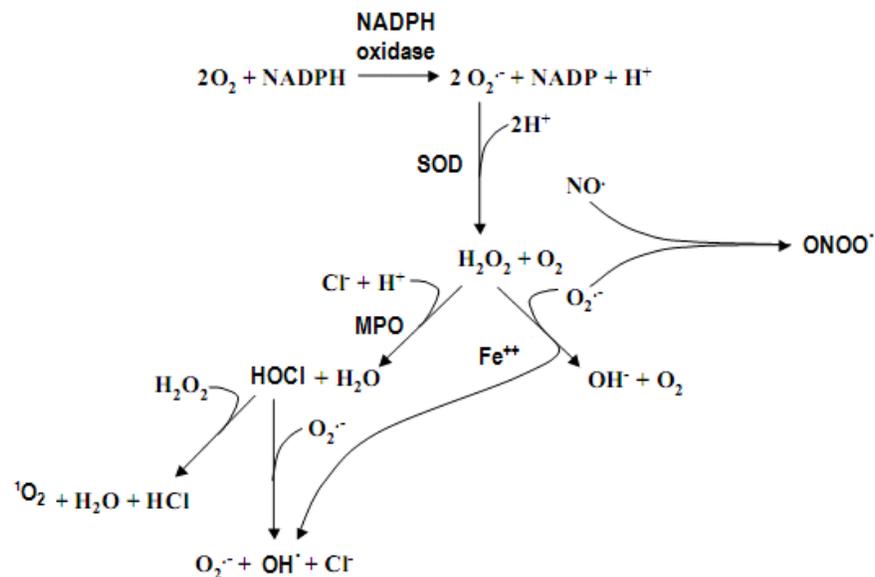


FIGURA 4 - GERAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOS REATIVOS PELA ATIVAÇÃO DE OUTRAS ENZIMAS DO *BURST* OXIDATIVO
 FONTE: BEUTLER, 2004.

2.4.2 Óxido Nítrico

O óxido nítrico (NO•) é um gás altamente permeável a membranas produzido por diferentes tipos de células, tais como células endoteliais vasculares, neurônios, células epiteliais do trato respiratório, fibroblastos, hepatócitos e macrófagos (SONG *et al.*, 2002).

O óxido nítrico tem importante atuação na defesa antimicrobiana, inflamação e angiogênese (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). Este gás apresenta efeitos diversos em todo o organismo, como o efeito vasoprotetor, mediador da angiogênese além de modular a proliferação de células musculares lisas em vasos sanguíneos (NAASEM, 2005). Quando produzido por macrófagos, o NO• atua no sistema imune como uma molécula efetora citostática e citotóxica, a qual inibe o crescimento de diversos agentes de doenças infecciosas como vírus, bactérias, protozoários, fungos e helmintos (SONG *et al.*, 2002)

O óxido nítrico é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), e possui três isoformas em mamíferos: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e induzível (iNOS) (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

A síntese de NO• ocorre a partir do átomo de nitrogênio do grupo guanidino do aminoácido L-arginina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) dependente de oxigênio molecular, como ilustrado na Figura 5 (MAYER; HEMMENS, 1997; STUEHR *et al.*, 2004). A síntese do óxido nítrico envolve duas etapas; na primeira ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da arginina, pelo O₂ e NADPH, para gerar o intermediário N-hidroxiarginina, e a segunda etapa é a conversão da N-hidroxiarginina em citrulina e óxido nítrico (LECHNER; LIRK; RIEDER, 2005).

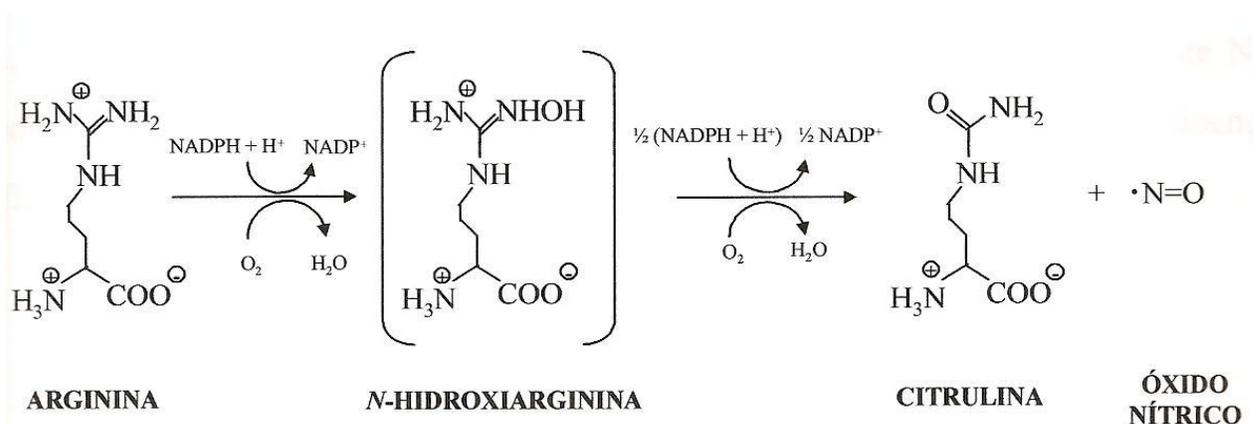


FIGURA 5 – ESQUEMA ILUSTRANDO AS REAÇÕES ENVOLVIDAS NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO ($NO\cdot$)

FONTE: MAYER; HEMMENS, 1997

O aumento da expressão do gene para a enzima iNOS se faz em resposta a diferentes estímulos, como as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-10, interferon-gama ($IFN-\gamma$), fator de necrose tumoral-alfa ($TNF-\alpha$), bactérias (por exemplo, BCG) ou produtos bacterianos (por exemplo, LPS), entre outros. Já, a inibição transcricional desta enzima pode ocorrer na presença de interleucinas IL-4, IL-8 e IL-10, fator de necrose tumoral β ($TNF-\beta$), entre outros (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1994; JAMES, 1995; MAYER; HEMMENS, 1997, KLEINERT 2004, KORHONEN, 2005).

2.4.3 Ativação de macrófagos e atividade antitumoral

O envolvimento direto de macrófagos na destruição de células tumorais ocorre por dois mecanismos distintos: citotoxicidade mediada por macrófagos, um processo relativamente lento e dependente de contato célula-célula e citotoxicidade celular dependente de anticorpo, processo pelo qual tanto os macrófagos como os monócitos são capazes de lisar células tumorais, através do reconhecimento e ligação das células alvo cobertas por anticorpo via receptor Fc

nas células efectoras (SHAW *et al.*, 1978; KAWASE *et al.*, 1985; KLIMP *et al.*, 2002).

Ambos os mecanismos irão culminar no estímulo da fagocitose ou na liberação de mediadores citotóxicos incluindo TNF- α , IL-1 β , NO \bullet e espécies reativas de oxigênio. Os mediadores TNF- α , IL-1 β , NO \bullet são considerados os mais importantes envolvidos diretamente na morte celular em tumores e são mais eficientes quando há contato célula-célula (KLIMP *et al.*, 2002). A susceptibilidade intrínseca das diferentes células tumorais e as condições de ativação das células efectoras são aspectos importantes envolvidos na morte de células tumorais (KLIMP *et al.*, 2002).

2.5 MORTE CELULAR

Em condições homeostáticas, em um indivíduo adulto, cada evento de duplicação celular deve ser compensado pela eliminação de outra célula, e apesar da morte celular ocorrer, no corpo humano, em uma frequência na ordem de milhões por segundo, um delicado balanço entre a proliferação e a morte celular regula o número de células em um organismo (GALLUZZI *et al.*, 2007).

Condições patológicas estão geralmente, senão sempre, ligadas a desregulação (tanto excessiva como deficiente) da morte celular (Figura 6). A AIDS, por exemplo, é causada pela perda das células do sistema imune, em uma velocidade que não é compensada pela proliferação e, ao contrário, o câncer é caracterizada pela supressão parcial das vias de morte celular (GALLUZZI *et al.*, 2007).

Três tipos de morte celular foram descritas: necrose, autofagia e apoptose.

Necrose, causada por infecções, envenenamento e intoxicação, usualmente afeta grupos de células contíguas e origina uma resposta inflamatória, pela liberação de diversos fatores pelas células mortas. Inchamento celular, ruptura da membrana plasmática, degeneração das organelas celulares são características morfológicas deste tipo de morte celular. Com a ruptura de

organelas pode ocorrer o vazamento de proteases dos lisossomos que estão envolvidos em desnaturação de proteínas celulares, como as histonas. Dessa forma, o nucleossomo se desfaz e o DNA pode ser clivado em sítios aleatórios (KROEMER; GALLUZZI; VANDENABEELE, 2009).

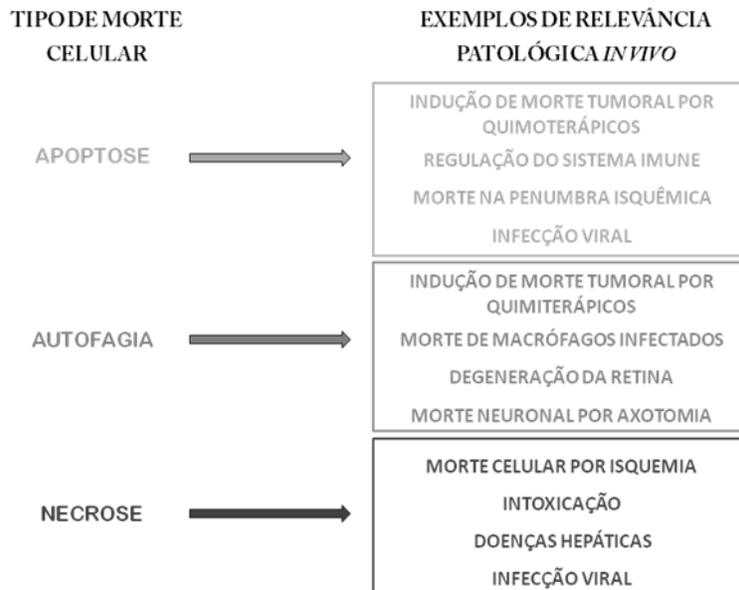


FIGURA 6 – RELAÇÃO ENTRE OS TIPOS DE MORTE CELULAR E DOENÇAS HUMANAS
 FONTE: Adaptado de GALLUZZI *et al.* (2006)

Autofagia é um processo catabólico que envolve a degradação dos componentes da própria célula pela maquinaria lisossomal. É um processo finamente regulado que participa da renovação de organelas e manutenção da bioenergia durante períodos de inanição. A formação de uma vesícula de dupla membrana (fagóforo) que internaliza o citoplasma e organelas é a característica marcante da autofagia. Na microautofagia apenas porções do citoplasma são internalizadas, enquanto que na macroautofagia todo o citoplasma está envolvido, o que pode resultar na total destruição da célula (processo conhecido por morte celular citoplasmática ou morte celular programada do tipo II) (KLIONSKY; CUERVO; SEGLEN, 2007).

A autofagia foi primeiramente ligada a tumorigênese quando foi reportado que o regulador de autofagia BECLIN1 estava deletado em muitos cânceres de mama, ovário e próstata, sugerindo que a autofagia pode ser um mecanismo de

supressão tumoral e, a partir disto, vários autores relacionaram defeitos na regulação da autofagia e sua influência na progressão tumoral (LOZY, KARANTZA, 2012).

Apoptose é uma forma de morte celular na qual uma seqüência programada de eventos leva a eliminação da célula sem a liberação de substâncias danosas para as células adjacentes. A apoptose possui um papel fundamental na manutenção da saúde por eliminar células velhas, doentes ou não mais necessárias (TINARI *et al.*, 2008). Uma célula em apoptose apresenta características típicas, como a diminuição do volume celular, fragmentação do DNA, condensação da cromatina, exposição de fosfatidilserina na camada externa da bicamada lipídica, colapso da estrutura do citoesqueleto e eventual formação dos corpos apoptóticos, em que a célula inteira se fragmenta em estruturas menores sem a liberação do conteúdo dos lisossomos, evitando assim, danos em células vizinhas. Estes corpos apoptóticos são posteriormente fagocitados e eliminados (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). A apoptose não causa reação inflamatória já que o conteúdo das células apoptóticas não é liberado nos tecidos vizinhos e as células são fagocitadas pelas células vizinhas, não produzindo citocinas inflamatórias (KUROSAKA *et al.*, 2003).

Existem duas vias atualmente elucidadas de iniciação da apoptose, a via extrínseca e a via intrínseca (Figura 7). A via extrínseca é importante na manutenção do equilíbrio tecidual, especialmente no sistema imune; e é iniciada por receptores na membrana chamados receptores da morte, que são ativados por citocinas como o TNF- α . Estes receptores possuem um domínio extracelular para reconhecer os ligantes e um domínio citoplasmático que é responsável por transmitir o sinal de morte celular da superfície para as vias de sinalização intracelular. A ativação destes receptores leva ao recrutamento de proteínas a um complexo sinalizador de morte celular (DISC), o qual ativa uma caspase iniciadora, a pró-caspase 8. Essa pró-caspase é clivada em caspase 8, que ativa uma caspase efetora (caspase 3). (HENGARTNER, 2000).

A via intrínseca é responsável pela apoptose causada por estímulos externos, como radicais livres, radiação e infecções virais, e também lesões

internas, como danos ao DNA. A apoptose pode ocorrer pela ausência de fatores de crescimento, hormônio e citocinas que causam a perda de estímulos supressores da apoptose. Essa via é dependente da mitocôndria e, de alguma forma, os estímulos citados, inicialmente, causam aumento da permeabilidade mitocondrial devido a abertura de um poro de transição de permeabilidade mitocondrial (MPT). As consequências desta mudança na permeabilidade são a perda do potencial transmembrana, liberação de fatores pró-apoptóticos para o citosol e a perda da função bioenergética da mitocôndria (KISCHKEL; HELBARDT; BEHRMANN, 1995; BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007).

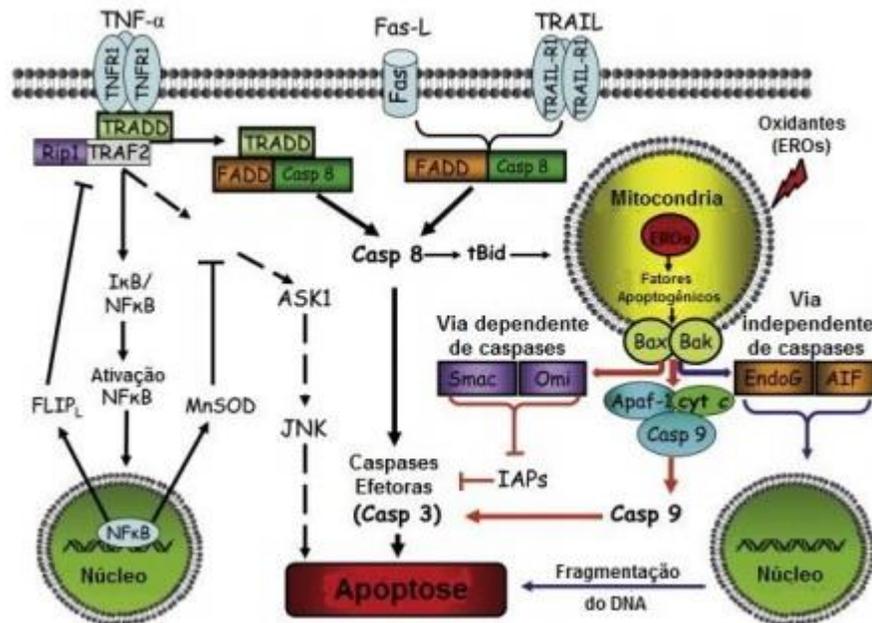


FIGURA 7 – VIAS INTRÍNSECA E EXTRÍNSECA DA APTOSE
 FONTE: Adaptado de CIRCU E AW (2010)

Dentre as proteínas liberadas, se inclui o citocromo c. O citocromo c induz a oligomerização de Apaf-1 (fator de ativação de apoptose 1), levando a ativação da caspase 9. O complexo citocromo c/Apaf-1/caspase-9 formam o apoptosomo e ativam as caspases efetoras 3 e 7 resultando num desmanche da célula através da fragmentação nuclear (HENGARTNER, 2000).

Também é descrito um tipo de apoptose que não depende de caspases. Neste mecanismo, a morte celular ocorre principalmente pela perda da função

mitocondrial devido à permeabilização da membrana mitocondrial externa, o que ocorre independentemente da ativação das caspases (ELMORE, 2007).

2.6 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Metabolismo secundário de plantas é definido como o conjunto de processos metabólicos que originam compostos que não possuem uma distribuição universal nos vegetais, por não serem necessários a todas as plantas (PERES, 2008). O metabolismo primário é responsável pela produção de substâncias indispensáveis à planta, as quais se formam devido ao processo fotossintético (CRUZ; NOZAKI; BATISTA, 2000). Diferente do primário, o metabolismo secundário não é essencial para o desenvolvimento do vegetal, mas é imprescindível para a sobrevivência de uma espécie dentro de um ecossistema, viabilizando a adaptação no ambiente, respondendo pelas relações e interações entre planta e ambiente (CRUZ; NOZAKI; BATISTA, 2000).

Esses compostos estão envolvidos na defesa contra herbívoros e patógenos, como atrativos para polinizadores e dispersão de sementes por animais, controle da germinação de sementes e inibição das espécies de plantas concorrentes (alelopatia). Também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição a UV e deficiência de nutrientes minerais. (BOURGAUD *et al.*, 2001; SANTOS, 2002; TAIZ, ZEIGER, 2004; MAKKAR *et al.*, 2007).

Os metabólitos secundários freqüentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Muitos são de importância comercial na área farmacêutica e alimentar, de perfumaria, ente outras. Muitos fármacos utilizados atualmente foram desenvolvidos a partir do isolamento de substâncias presentes em plantas.

Os metabólitos secundários são sintetizados por várias rotas biossintéticas que produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais (ALVES, 2001). A origem de todas essas moléculas pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (Figura 8). O primeiro origina os aminoácidos aromáticos, que por sua vez tem como sucessores a maioria dos metabólitos secundários aromáticos. Já os derivados do acetato, podem ser classificados segundo a via metabólica em derivados do acetato via ciclo do ácido cítrico, derivados do acetato via mevalonato e produtos da condensação do acetato (SANTOS, 2002).

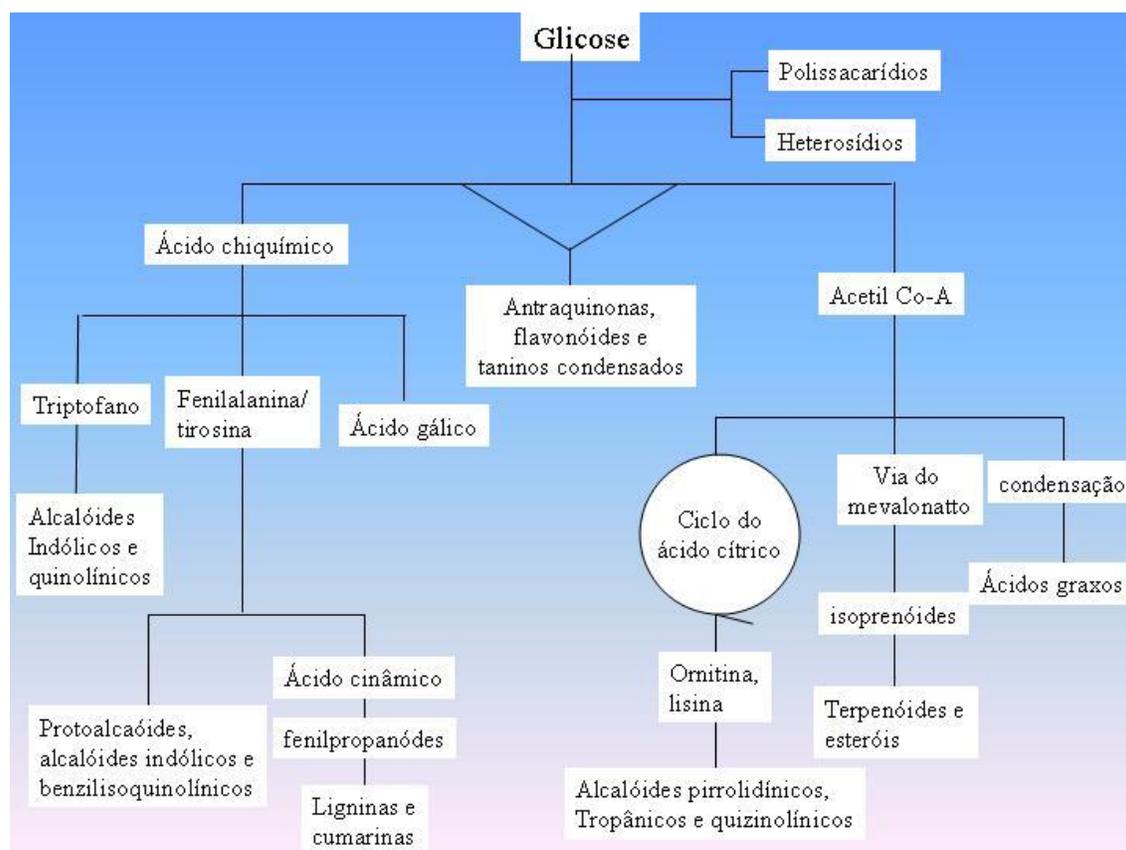


FIGURA 8 – VIAS DE SÍNTESE, DEGRADAÇÃO E INTERCONVERSÃO DAS MOLÉCULAS DO METABOLISMO SECUNDÁRIO DE PLANTAS
 FONTE: SANTOS, 2002.

Estas diferentes vias dão origem a três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são feitos a

partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (PERES, 2008).

Os terpenos originam-se da via do acetato-mevalonato a partir de uma unidade de isopreno. São precursores de três classes hormonais de plantas, as citocininas, o ácido abscísico e as giberelinas. Sua classificação é feita de acordo com a quantidade de unidades de isopreno em: hemiterpenóides (C5); monoterpenóides (C10); sesquiterpenóides, (C15); diterpenóides, (C20); triterpenóides, (C30); e carotenóides, (C40) (PERES, 2008).

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos com estruturas bastante diversificadas e possuem pelo menos um anel aromático no qual, pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH) Os compostos fenólicos tendem a se solubilizar em água e podem estar ligados a açúcares. Existem cerca de cinco mil fenóis, dentre eles, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, taninos, ligninas e tocoferóis (CARVALHO *et al.*, 2002).

Já os alcalóides são definidos como substâncias orgânicas cíclicas contendo um nitrogênio e cuja distribuição é limitada entre os organismos vivos. São compostos farmacologicamente ativos e encontrados predominantemente em angiospermas (HENRIQUES *et al.*, 2002).

2.7 *Endopleura uchi* (UXI)

Endopleura uchi (Huber) Cuatrec., pertencente à família Humiriaceae, é uma espécie originária da Amazônia. É popularmente conhecida por uxi, uchi ou uchi-pucu sendo encontrada em mata de terra firme por toda a extensão da Bacia Amazônica (SCHULTES, 1979).

É uma árvore que atinge 20-30 m, dotada de copa subglobosa, tronco ereto e cilíndrico de 60-90 cm de diâmetro, com casca espessa. As folhas são alternadas e simples de 10-20 cm de comprimento por 3-8 cm de largura. As inflorescências são cimosas (onde cada eixo termina em uma flor), com muitas flores perfumadas de cor esverdeada com estames amarelos. O fruto é carnoso com apenas uma semente e o mesocarpo oleoso, aromático e resinoso (Figura 9) (LORENZI, 2002).

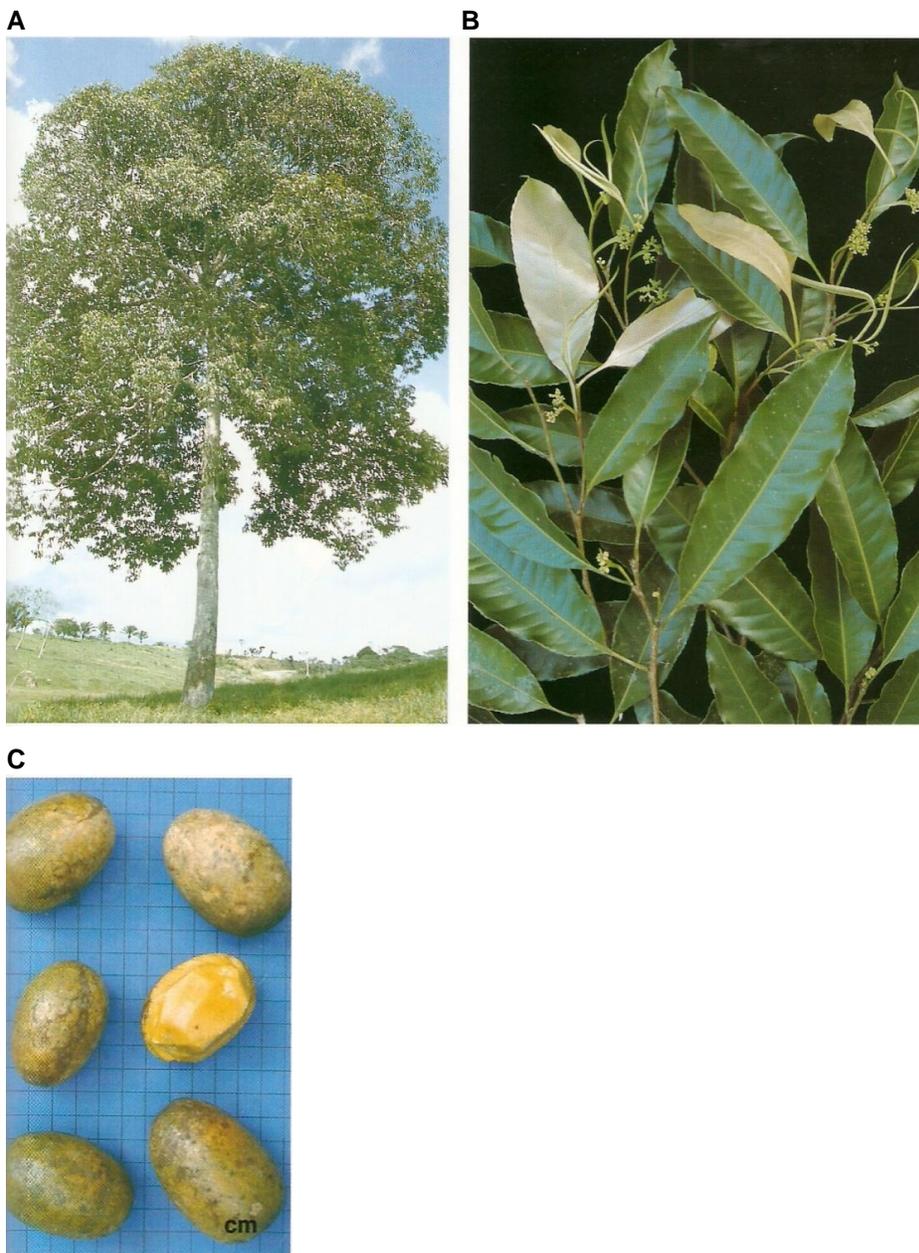


FIGURA 9 – (A) ASPECTO GERAL, (B) INFLORESCÊNCIAS E (C) FRUTOS DE *E. UCHI* (UXI)
FONTE: LORENZI, 2002.

O fruto desta espécie representa um mercado em expansão, visto que tem sido considerado de grande importância para a subsistência de muitas comunidades nesta última década, sendo comercializados em feiras livres e muito apreciados pela população Amazônica. A polpa *in natura* do uxi é consumida pura bem como na fabricação de sorvete e licor (LORENZI, 2002; SHANLEY; LUZ; SWINGLAND, 2002).

A polpa do fruto contém um alto conteúdo de gordura, majoritariamente composta de ácido oléico, além da presença de fibras, minerais, vitaminas C e E, carotenóides, fitosteróis e tocoferóis. Cerca de 40 compostos voláteis, que consistem principalmente de 3,3-dimetil-2-butanol e eugenol também foram identificados (MARX *et al.*, 2002; MAGALHÃES *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2010).

A madeira desta espécie é utilizada na construção civil, marcenaria e carpintaria. Além da importância econômica nos muitos usos madeireiros, o chá da casca da árvore é utilizado popularmente como anti-inflamatório, e também contra infecções urinárias e miomas (CORRÊA, 1984; REVILLA, 2001; RODRIGUES, 2007). A partir do extrato metanólico da casca desta espécie foi isolado o composto bergenina (uma isocumarina), que inibiu seletivamente a enzima COX-2, a qual está presente na via inflamatória (NUNOMURA *et al.*, 2009). Testes *in vitro* utilizando o extrato aquoso da casca desta espécie demonstraram atividade antimicrobiana seletiva contra três espécies de *Candida* sp.: *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*, o que auxilia na compreensão do uso tradicional do chá de *E. uchi* contra infecções urinárias (SILVA *et al.*, 2009).

Apesar do amplo potencial econômico e biológico, esta espécie carece de estudos referentes aos componentes presentes tanto no fruto quanto na casca, além de pesquisas que comprovem a sua eficácia nos seus diversos usos populares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL DE ESTUDO

As cascas do caule de *Endopleura uchi* foram adquiridas da empresa Chá & Cia – Ervas Medicinais para Chá (número do lote: uxi 19/05, data de validade: Dezembro de 2011), localizada em Jacareí – SP.

3.2 PREPARO DO DECOCTO DAS CASCAS DE *E. uchi*

Os decoctos foram preparados de acordo com as instruções da empresa Chá & Cia: duas colheres de sopa (aproximadamente 10 gramas) de uxi para meio litro de água e fervura durante 10 min. O decocto foi concentrado em rotaevaporador a vácuo, na temperatura de 50 °C, e centrifugado por 20 min a 10.000 rpm em centrífuga SORVALL T6000D, originando uma fração denominada UX.

3.3 ISOLAMENTO DOS POLISSACARÍDEOS PRESENTES NA DECOCCÃO

O decocto concentrado também foi tratado com 3 volumes de etanol absoluto. O material precipitado foi separado por centrifugação, lavado 2 vezes com etanol absoluto e seco em estufa a vácuo, originando uma fração denominada AGb.

Este processo foi repetido até a obtenção de quantidade suficiente de polissacarídeos para as etapas de purificação e caracterização.

3.4 PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO OBTIDO POR DECOCCÃO DAS CASCAS DE *E. uchi*

Os polissacarídeos obtidos da precipitação etanólica do decocoto de *E. uchi* foram purificados utilizando as seguintes técnicas:

3.4.1 Fracionamento por congelamento/degelo

A fração AGb foi solubilizada em água destilada, congelada e, posteriormente, descongelada a temperatura ambiente. O material insolúvel em água fria foi isolado do sobrenadante por centrifugação (15,000 rpm, 10 min, 4 °C). Esse processo foi repetido até que a partir do sobrenadante aquoso não se formasse mais precipitado após congelamento e descongelamento. O sobrenadante foi reunido, concentrado e liofilizado.

3.4.2 Precipitação com solução de Fehling

A fração liofilizada solúvel obtida do fracionamento por congelamento e degelo foi tratada com solução de Fehling (JONES; STOODLEY, 1965). Esta solução é formada por duas soluções A e B. A amostra foi solubilizada diretamente na solução B (tartarato de potássio e sódio + hidróxido de potássio) e a este se adicionou volume equivalente de solução A (sulfato de cobre). Após

agitação manual, a solução permaneceu sob agitação por 24 h. O precipitado foi separado por centrifugação (15,000 rpm, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante deste fracionamento foi neutralizado com ácido acético e dialisado contra água corrente por 72 h, concentrado e liofilizado.

3.4.3 Fracionamento por ultrafiltração

A fração solúvel da precipitação com Fehling foi submetida a ultrafiltração em membrana com limite de exclusão de 30 kDa (Millipore). A amostra foi filtrada por um sistema de filtração acoplado a um cilindro de ar comprimido. Em seguida, as amostras eluída e retida na membrana foram congeladas e liofilizadas.

3.5 ANALISE DOS POLISSACARÍDEOS

3.5.1 Determinação da composição monossacarídica

Os polissacarídeos das frações obtidas foram hidrolisados com TFA 2 mol/l durante 5 h a 100 °C em banho fervente (ADAMS, 1978). Após a hidrólise, o excesso de ácido foi removido por evaporação.

Os produtos de hidrólise foram reduzidos com boroidreto de sódio (NaBH_4) em meio aquoso a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963a). Em seguida, as soluções reduzidas foram tratadas com resina catônica para remoção do cátion sódio (Na^+) e para decompor o excesso do agente redutor. A seguir, o material foi filtrado, evaporado até secura e lavado sucessivamente com metanol para remoção do ácido bórico remanescente, na forma de borato de trimetila. Os acetatos de alditóis formados foram acetilados com uma mistura de anidrido

acético:piridina (1:1 v/v) durante 16 h a temperatura ambiente (WOLFROM; THOMPSON, 1963b). A reação de acetilação foi interrompida com a adição de gelo moído e o material acetilado extraído com clorofórmio. A piridina residual foi removida por sucessivas e intercaladas lavagens com sulfato de cobre 5% e água. A fase clorofórmica foi recolhida, transferida para um tubo de hemólise, evaporada a temperatura ambiente e analisada por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

3.5.2 Análise de metilação

O polissacarídeo (AG) foi metilado de acordo com o método descrito por Kvernheim (1987). O polissacarídeo (2 mg) foi seco durante a noite em pistola a vácuo contendo P_2O_5 . Sob atmosfera de nitrogênio, foi adicionado 400 μ l de DMSO e a amostra foi mantida a 50 °C por 2 h sob agitação magnética. Em seguida, a amostra foi resfriada a temperatura ambiente e adicionado 100 μ l de butil-lítio (15% em hexano). A solução foi aquecida a 40 °C e mantida sob agitação por 1 hora. Após este tempo, a amostra foi resfriada em banho de gelo até congelar e adicionado 200 μ l de iodeto de metila. A mistura foi deixada descongelar e agitada por 1 hora a temperatura ambiente. O polissacarídeo metilado foi extraído utilizando 3 ml de clorofórmio:metanol (2:1), a mistura foi agitada e em seguida, foi adicionado 2 ml de água destilada. A fase clorofórmica foi lavada mais três vezes com água destilada e evaporada (90 °C). O processo de metilação foi repetido mais uma vez e em seguida, o material metilado foi hidrolisado com 1,0 ml de ácido fórmico 90% em banho fervente por 1 h. Posteriormente, foi adicionado 1,0 ml de TFA 2 mol/l e a amostra permaneceu por mais 2 h em banho fervente. O ácido foi evaporado a temperatura ambiente e o metilado foi ressuspensão em água destilada, reduzido com $NaBH_4$ e acetilado conforme descrito no item 3.5.1. Após derivatização, os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS).

3.5.3 Carboxi-redução

O processo de carboxi-redução foi realizado segundo Taylor e Conrad (1972), e consiste na reação de ácidos carboxílicos com carbodiimidas, gerando ésteres que podem ser reduzidos na presença de NaBH_4 . Neste caso, as unidades de ácidos urônicos de um polissacarídeo são convertidas no seu açúcar neutro correspondente.

O polissacarídeo AG (100 mg) foi solubilizado em 10 ml de tampão MES 0,2 mol/l (ácido 2-(*N*-morfolina)-etanossulfônico), pH 4,75. A seguir, adicionou-se, pouco a pouco e sob agitação, 154 mg de CMC (1-ciclo-hexil-3-(2-morfolinoetil)carbodiimida metap-toluenossulfonato). A mistura de reação ficou sob agitação por um total de duas h. Em seguida, adicionou-se tampão TRIS (2 mol/l, pH 7,0) até pH 7,0. Posteriormente, acrescentou-se NaBH_4 vagarosamente, na presença de octanol, até concentração final de 2 mol/l. Para análise de metilação do polissacarídeo carboxireduzido foi utilizado NaBD_4 . A solução permaneceu sob agitação durante a noite e a reação foi interrompida pela adição de ácido acético até pH 5. Finalmente, o material foi dialisado em membranas com limite de exclusão de 12.000 Da durante 48 h, concentrado e liofilizado.

3.6 MÉTODOS ANALÍTICOS

3.6.1 Métodos cromatográficos

3.6.1.1 Cromatografia líquido-gasosa (GLC)

Para determinação dos açúcares neutros presentes nas frações polissacarídicas, a cromatografia líquido-gasosa (GLC) foi realizada em um cromatógrafo THERMO Trace GC Ultra, equipado com detector de ionização em chama, utilizando hélio como gás de arraste, com fluxo de 1 ml/min. Uma coluna capilar de sílica fundida DB-225 [30 m x 0,25 mm (d.i.)] foi usada, com espessura de filme 0,25 µm, sendo a temperatura do detector 300 °C e do injetor 250 °C.

3.6.1.2 Cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS)

Para determinação dos derivados metilados, a cromatografia líquido-gasosa acoplada a espectrometria de massa (GLC-MS) foi realizada em um cromatógrafo Varian Saturn 2000R - 3800 acoplado a um espectrômetro de massa Varian Ion-Trap 2000R, utilizando a coluna capilar de sílica fundida DB-225 (30 m x 0,25 mm) e hélio ultrapuro, a um fluxo de 1 ml/min, como gás de arraste. Os acetatos de alditóis parcialmente metilados foram analisados por este equipamento a uma temperatura de 50 - 210 °C (40 °C/min).

3.6.1.3 Determinação da homogeneidade e massa molar

As amostras foram solubilizadas em nitrito de sódio (NaNO_2) 0,1 mol/l contendo azida de sódio (NaN_3) 0,2 g/l em uma concentração de 1 mg/ml, sendo filtradas através de membrana de acetato de celulose com tamanho de poro 0,22 µm. Em seguida, foram aplicadas em cromatógrafo de exclusão estérica de alta pressão (HPSEC) equipado com detector de índice de refração (RI), modelo WATERS 2410, detector de ultravioleta (UV) Pharmacia LKB modelo VW 2251 e

com detector de espalhamento de luz multiângulos (MALLS) WYATT TECHNOLOGY, modelo DAWN DSP com 18 canais, acoplados em série. Foram utilizadas quatro colunas de gel permeação WATERS em série, com limites de exclusão de 7×10^6 , 4×10^5 , 8×10^4 e 5×10^3 utilizando como eluente o mesmo solvente da solubilização da amostra e o fluxo monitorado por bomba peristáltica WATERS 515. Para análise de homogeneidade, o fluxo foi de 0,6 ml/min.

A taxa de variação do índice de refração com a concentração (dn/dc) das amostras homogêneas foi determinada, sendo que para cada amostra foram utilizadas cinco diferentes concentrações (máximo 1 mg/ml) diluídas em NaNO_2 0,1 mol/l com NaN_3 0,2 g/l. A massa molecular ponderal média foi calculada pelo programa ASTRA utilizando os valores de dn/dc previamente obtidos.

3.6.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises de HPLC foram realizadas em cromatógrafo Agilent 1100 Series com amostrador automático G1313A e detector de arranjo de fotodiodos. A coluna utilizada foi Kinetex C-18 7.8 x 150 mm. O fluxo utilizado foi de 0,2 ml/min, utilizando um gradiente de acetonitrila de 10 a 100% em 120 min a temperatura ambiente.

3.6.1.5 Cromatografia em camada delgada (TLC)

A cromatografia em camada delgada foi usada para avaliar os metabólitos de baixa massa molar presentes nas cascas de *Endopleura uchi*. As análises foram realizadas em placas de sílica gel 60G (MERCK) com 8 cm de altura total. Foram utilizadas duas fases móveis: uma mais polar (acetato de etila:metanol:água 110:13,5:10) e outra mais apolar tolueno:acetato de etila (95:5).

Para a visualização dos metabólitos foram utilizados diferentes reveladores, conforme Tabela 1.

TABELA 1 – REVELADORES UTILIZADOS NA INVESTIGAÇÃO DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NAS CASCAS DE *E. uchi*

Composto	Reagente	Modo de preparo	Deteção
Glicosídeos cardiotônicos	reagente de Kedde	Acido dinitrobenzóico 3% em etanol e NaOH 2M misturados 1:1	Presença bandas violáceas
Alcalóides	reagente de Drogendorff	(a) 0,85 mg nitrato de bismuto básico em ácido acético glacial e 40 ml de água (b) 8 g de iodeto de potássio em 30 ml de água Misturar 0,5 ml de (a) e (b), 2 ml ácido acético glacial e 10 ml água	Presença de bandas amareladas ou laranjadas
Óleos essenciais Saponinas Taninos	vanilina-ácido sulfúrico	Vanilina 10% em etanol seguido de H ₂ SO ₄ 10% em etanol e aquecimento a 120 °C	Presença de bandas violáceas e marrons
Cumarinas Antracenos	KOH 10%	KOH 10% em etanol	Aumento da intensidade em UV 366
Flavonóides	NP/PEG (reagente produtos naturais polietilenoglicol)	éster difenilborato de 2-aminoetil 1% em metanol seguido de etilenoglicol 5% em etanol	Aumento da intensidade em UV 366 nm

FONTE: WAGNER; BLADT (1996).

3.6.2 Métodos espectroscópicos

3.6.2.1 Espectrometria de ressonância magnética nuclear

As análises de ressonância magnética nuclear de ^{13}C foram realizadas em espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance, em tubos de 5 mm de diâmetro, em temperatura de 70°C. Os deslocamentos químicos, expressos em δ (ppm), foram determinados utilizando acetona como padrão interno para as análises de ^{13}C (δ 31,45). As amostras foram dissolvidas em D_2O .

3.6.2.2 Espectrometria de infravermelho

A amostra AG foi analisada por espectroscopia de infravermelho (FT-IR - Fourier transform-infrared), em espectrofotômetro BOMEM MB-100. Os espectros foram coletados no modo de absorbância na frequência de 4000-400 cm^{-1} , numa resolução de 4 cm^{-1} , 32 scans, empregando amostras sólidas pulverizadas. Foram preparadas pastilhas usando 2 mg de polissacarídeo para 148 mg de brometo de potássio (KBr) de grau espectroscópico. Como branco utilizou-se uma pastilha de KBr. Antes da preparação das pastilhas, o KBr foi desidratado a 120 °C durante 24 h e as amostras secas com P_2O_5 sob vácuo.

3.7 DOSAGENS COLORIMÉTRICAS

Açúcares totais foram dosados pelo método fenol sulfúrico (DUBOIS *et al.*, 1956), no qual são adicionados fenol e ácido sulfúrico à amostra solubilizada em água, resultando na formação de coloração alaranjada, e a leitura realizada no comprimento de onda de 490 nm em espectrofotômetro SP-22 Biospectro®. As leituras foram realizadas em triplicatas e foi utilizada como padrão uma solução de glucose em diferentes concentrações.

Os teores de proteínas foram determinados pelo método de Bradford, 1976, que consiste na adição de solução do corante Comassie Brilliant Blue G-250

à amostra solubilizada em água e a conseqüente formação de um complexo de cor azul. As leituras foram realizadas em triplicatas no comprimento de onda de 595 nm e soroalbumina bovina (BSA) utilizada como padrão.

A dosagem de ácidos urônicos foi determinada pelo método de Blumenkrantz e Asboe-Hansen (1973), onde são adicionados meta-hidroxibifenil e tetraborato de sódio em ácido sulfúrico a amostra, ocorrendo à formação de uma coloração rosa. As leituras das amostras foram em triplicata utilizando-se comprimento de onda de 520 mn e ácido galacturônico como padrão.

3.8 SOLUÇÕES E PROCEDIMENTOS UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

3.8.1 Solução salina tamponada (PBS)

A solução salina tamponada (PBS) em pH 7,4 foi preparada como solução estoque 5 vezes concentrada, sendo constituída por: Na_2PO_4 40,5 mM, KH_2PO_4 7,3 mM e NaCl 680 mM. Esta solução concentrada foi esterilizada em autoclave a 120°C, durante 30 min e armazenada a 4°C. Para o uso, a solução foi diluída com água ultra pura estéril.

3.8.2 Solução salina balanceada de Hanks (HBSS)

A solução salina balanceada de Hanks (HBSS) (HANKS; WALLACE, 1949) foi preparada através da mistura de duas soluções A e B, as quais foram preparadas na forma de soluções estoque 20 vezes concentradas. A solução A era constituída por NaCl 2,737 mM, KCl 104 mM, CaCl_2 19,7 mM e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

16,2 mM e a solução B apresentava como constituintes Na_2HPO_4 8,4 mM, KH_2PO_4 8,7 mM, glucose 100 mM. As duas soluções foram misturadas e diluídas em água bidestilada ou água MilliQ e seu pH ajustado para 7,4. A solução resultante foi esterilizada por filtração em membrana estéril com poros de 0,22 μm em câmara de fluxo laminar.

3.8.3 Solução de Tripsina-EDTA

A solução de tripsina-EDTA utilizada foi constituída de NaCl 137 mmol/l, KCl 5,4 mmol/l, glucose 5 mmol/l, Na_2HPO_4 , 0,42 mmol/l, KH_2PO_4 0,44 mmol/l, NaHCO_3 2,3 mmol/l, EDTA 0,53 mmol/l, 50 mg/% tripsina (1:250) e 2 mg/% de vermelho de fenol, sendo o pH ajustado para 7,4 com solução de bicarbonato de sódio 8 mmol/l. Posteriormente, a solução foi esterilizada por filtração em membrana de acetato-nitrato de celulose com poros de 0,22 μm sob pressão em aparelho Sartorius. A solução foi armazenada em frascos estéreis e mantida em geladeira a 4°C.

3.8.4 Meio de cultura

O meio mínimo essencial (MEM) e o meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) foram reconstituídos em água MilliQ e esterilizados por filtração sob pressão com membrana de acetato de celulose estéril com poro de 0,22 μm . Este meio foi suplementado com HEPES 10 mM estéril, 100 U/ml de penicilina, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino para células HeLa e CCRF-CEM e 5% de soro fetal bovino para macrófagos peritoneais.

3.8.5 Linhagem celular

As células HeLa foram isoladas em 1951, sendo originárias de carcinoma de cérvix uterino humano, de uma paciente chamada Henrietta Lacks. Foi a primeira linhagem celular aneuplóide e de característica epitelial, derivada de tecido humano, a ser mantida continuamente em cultura celular em série (SKLOOT, 2007).

As células HeLa foram adquiridas junto ao Instituto Adolpho Lutz. As células foram mantidas em nitrogênio líquido. Primeiramente, suspensões de células HeLa (10^6 células/ml) em meio composto por MEM 40% (v/v), acrescido de soro fetal bovino 50% (v/v) e DMSO 10% (v/v), foram congeladas a -20 °C por no mínimo 2 h, a seguir a -70 °C por no mínimo 12 h e, por último, armazenadas em nitrogênio líquido.

Para realização dos experimentos, realizados no Laboratório de Oxidações Biológicas do Departamento de Bioquímica, as células foram descongeladas a 37 °C em banho, adicionadas em garrafas de cultivo, acrescidas de meio MEM suplementado com 10% de SFB e mantidas em estufa de CO_2 (5%) a 37 °C. Após adesão das células à superfície da garrafa (mínimo 2 h), o meio foi substituído por novo meio MEM, eliminando-se do meio DMSO e eventuais células mortas. Para os repiques celulares, o meio foi descartado e as monocamadas confluentes descoladas das garrafas de cultivo por tratamento com a solução de tripsina-EDTA.

A linhagem CCRF-CEM foi estabelecida em 1963 a partir da cultura contínua do sangue periférico de uma criança com leucemia aguda (FOLEY *et al.*, 1965). Esta linhagem consiste de linfócitos leucêmicos e são células que crescem em suspensão. Esta linhagem foi adquirida junto ao ATCC (*American Tissue Culture Collection*). Para realização dos experimentos, as células foram descongeladas a 37 °C, centrifugadas (4000 rpm, 5 min), e ao *pellet* foi acrescido meio RPMI suplementado com 10% de SFB. As células foram transferidas para garrafas de cultivo e mantidas em estufa de CO_2 (5%) a 37 °C. Esta linhagem

celular foi utilizada nos experimentos de fracionamento guiado de metabólitos secundários realizados durante doutorado sanduíche na Karl-Franzens Universität sob orientação do Prof. Dr. Rudolf Bauer.

Para a aquisição de macrófagos peritoneais de camundongos, o projeto foi submetido a avaliação do comitê de Ética para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas, o qual recebeu autorização de número 585. Os camundongos foram eutanasiados e, após assepsia com álcool iodado e exposição do peritônio, 10 ml de PBS foi injetado na cavidade peritoneal com auxílio de seringa e agulha estéreis. Após massagem vigorosa da região abdominal, as células do exsudato peritoneal foram aspiradas e transferidas para um tubo plástico estéril, sendo mantidas em banho de gelo. Posteriormente, as células foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min a 4°C, o *pellet* formado foi ressuspenso em meio MEM suplementado com 5% de SFB e as células contadas em câmara de Neubauer. As células foram plaqueadas em placa de cultura estéril e deixadas para aderir durante 2 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂.

3.8.6 Preparo das soluções das amostras para avaliação da atividade biológica

Para os testes de atividade biológica, os polissacarídeos e as infusões foram solubilizados em água ultrapura na concentração de 5 mg/ml e esterilizados por filtração em membrana de acetato celulose estéril com poro de 0,22 µm. Em seguida, as soluções foram diluídas em meio MEM para as concentrações adequadas para cada experimento. Já as amostras obtidas dos fracionamentos dos extratos orgânicos foram solubilizadas em DMSO na concentração de 10 mg/ml e diluídas em água ultra pura estéril para as concentrações de 1 e 0,5 mg/ml. Utilizando estas últimas soluções, as células foram tratadas com volumes adequados afim de se obter as concentrações finas de 100, 50 e 10 µg/ml).

3.9 DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Para células HeLa, a viabilidade celular foi quantificada após 24 e 48 h utilizando o método do cristal violeta (KUENG; SILBER; EPPENBERGER, 1989). Para este ensaio, as células HeLa foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^4 cél/poço, armazenadas em estufa com condições adequadas para aderirem (5% de CO₂ a 37 °C). Após 24 h de permanência na estufa, o meio foi retirado e foram adicionados as amostras UX, AGb e AG nas concentrações entre 5 - 500 µg/ml. Os tempos de tratamento foram de 48 e 72 h. Após este tempo, o meio foi retirado e as células fixadas com metanol. Em seguida, o metanol foi retirado e acrescentado uma solução do corante cristal violeta (0,2% em etanol 2%). Os poços foram lavados com PBS, seguindo-se a adição de citrato de sódio 0,05 mol/l em etanol 50%. A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas Epoch, utilizando comprimento de onda de 490 nm.

Para células CCRF-CEM, a viabilidade celular foi determinada pelo método do XTT (2,3-bis- (2-metil-4nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-hidróxido de tetazólio (MARSHALL; GOODWIN; HOLT, 1999). Neste ensaio, o XTT sofre ação das desidrogenases mitocondriais e é convertido em sal de formazan solúvel em água. As células CCRF-CEM foram plaqueadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^5 cél/poço e logo após o plaqueamento os tratamentos foram realizados nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/ml. O tempo de tratamento foi de 72 h. Após este tempo, foi adicionado 50 µl do reagente XTT a cada poço e a absorbância das amostras foi medida diretamente em leitor de microplacas, utilizando comprimento de onda de 490 nm.

Para macrófagos peritoneais, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio) de acordo com Reilly *et al.* (1998). Este método baseia-se na redução do MTT por desidrogenases de células viáveis. Os macrófagos foram plaqueados (4×10^5 cél/poço) em placas de 96 poços e deixadas em estufa para aderirem a 37 °C, em

atmosfera de CO₂ 5% por 2 h. Após aderência foram adicionadas soluções de UX, AGb e AG nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/ml. Após 48 h, o meio foi retirado e substituído por de HBSS acrescido de solução de MTT (5 mg/ml em HBSS), obtendo-se uma concentração final de 0,5 µg/ml. As células, então, foram incubadas por 3 h a 37 °C, em atmosfera de 5% CO₂ e, após esse tempo, o sobrenadante foi retirado e DMSO foi adicionado para dissolução os cristais de formazan. A absorbância das amostras foi medida em leitor de microplacas Epoch, utilizando comprimento de onda de 550 nm.

3.10 OBTENÇÃO DA CURVA DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A avaliação da proliferação celular foi realizada pelo método de exclusão do azul de Trypan. A técnica baseia-se na capacidade deste corante penetrar no interior de células que perderam a integridade da membrana plasmática, sendo estas consideradas como células não viáveis. Para tanto, células HeLa foram plaqueadas (5×10^4 células por poço) em placas de 24 poços. As células foram mantidas em estufa nas condições adequadas para sua adesão conforme anteriormente citado. Após 24 h, o meio foi substituído por outro contendo os polissacarídeos em estudo nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/ml para UX, AGb e AG. Este momento foi considerado o tempo 0 para a construção da curva de crescimento. As células foram então, mantidas em estufa pelos tempos de tratamento de 24, 48 e 72 h. Após cada tempo de tratamento, o sobrenadante foi descartado e as células aderidas foram soltas adicionando-se tripsina-EDTA e ressuspendidas em meio. A solução de azul de Trypan 0,4% m/v em PBS, foi adicionado à suspensão de células na proporção de 1:10 corante:amostra e imediatamente em seguida, as células não coradas pelo azul de Trypan, ou seja, as células viáveis, foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico (OLYMPCUS, mod.KW1).

3.11 ANÁLISE DE CICLO CELULAR POR CITOMETRIA DE FLUXO

Células HeLa foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 células em placas de plástico de 60 mm de diâmetro. Após 24 h de adesão em estufa a 37°C sob atmosfera de 5% de CO_2 , o sobrenadante foi descartado e realizado o tratamento das células com UX, AGb e AG nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$ ambos pelo tempo de 72 h. Após o tempo de tratamento as células foram coletadas para análise em citômetro de fluxo. Inicialmente, o sobrenadante foi coletado. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e coletadas após a adição de tripsina-EDTA e posterior inativação com meio de cultura. As células foram centrifugadas a 500g por 3 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* celular obtido, foi lavado duas vezes com PBS. Em seguida, adicionou-se 300 μL de tampão hipotônico ao *pellet* celular. A suspensão foi mantida por 20 minutos a 4°C ao abrigo da luz. A análise do ciclo celular foi realizada em aparelho FACScalibur (BD), adquirindo-se 10.000 eventos utilizando o filtro de fluorescência FL2. As análises foram realizadas pelo software WinMDI 2.9, utilizando histograma, sendo no eixo X o filtro FL2 e no eixo Y o número de eventos.

3.12 MORFOLOGIA CELULAR

As células HeLa e macrófagos peritoneais foram plaqueadas na densidade de 5×10^4 e 4×10^5 células por poço em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares. Após o período de 24 e 2 h para células HeLa e macrófagos peritoneais, respectivamente, de adesão em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , o sobrenadante foi retirado e substituído pelos tratamentos UX, AGb e AG nas concentração de 100 e 250 $\mu\text{g/mL}$. Após o período de tratamento de 72 e 48 h para células HeLa e macrófagos peritoneais, respectivamente, o sobrenadante foi

descartado e as células foram lavadas duas vezes com PBS para posterior fixação com Bouin (formaldeído:ácido pícrico saturado: ácido acético, 4:15:1) por 5 minutos. Em seguida as células foram desidratadas em solução etanólica 70% e coradas com hematoxilina por 1 minuto e 30 segundos. O excesso do corante foi retirado com água ultrapura. Posteriormente, procedeu-se a coloração com eosina pelo tempo de 30 segundos, sendo o excesso retirado com álcool 70%. Após coloração, as células foram desidratadas em soluções de acetona e xilol e montadas em lâminas com Entellan.

3.13 MARCAÇÃO COM ANEXINA-V E IODETO DE PROPIDIO

Células HeLa (5×10^4 células/poço) foram plaqueadas em placas de plástico de 60 mm de diâmetro. Após 24 h de adesão, as células foram tratadas com UX, AGb e AG nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$ por 72 h. Após o tratamento, o sobrenadante foi coletado e, em seguida, as células foram lavadas duas vezes com PBS e coletadas após a adição de tripsina-EDTA e posterior inativação com meio de cultura. As células foram centrifugadas a 500g por 3 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspensão em 1 ml do tampão de ligação (NaCl 150 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1 mM e CaCl₂ 1,8 mM em HEPES 10 mM pH 7.4) e 100 μl foi transferido para um eppendorf. A este eppendorf, foi adicionado 5 μl de anexina V-FITC (BD) e 10 μl de solução de iodeto de propídeo e mantida por 20 minutos ao escuro. As células foram avaliadas em citômetro de fluxo, no aparelho FACScalibur (BD), sendo adquiridos 10.000 eventos utilizando os filtros FL1 para anexina V e FL2 para PI, por meio do programa CellQuest. As análises foram realizadas utilizando um gráfico do tipo dot-plot (eixo X: filtro FL1 e eixo Y: filtro FL2) pelo software WinMDI versão 2.9.

3.14 LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C

A avaliação da liberação de citocromo c foi realizada de acordo com metodologia descrita por APPAIX et al. (2000), com algumas modificações.

As células foram plaqueadas na densidade de 1×10^6 células/placa em placas de 60 mm e acondicionadas por 24 h em estufa a 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 para aderirem. Após adesão, as células foram tratadas com as concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$ de UX, AGb e AG por 72 h. Após este tempo, as células foram coletadas com adição de tripsina e ressuspensas em meio de cultura. Dessa suspensão celular, 50 μl foi reservado para a determinação de proteínas pelo método de Bradford (1956). O restante da suspensão foi centrifugado e o *pellet* ressuspenso em 200 μl da solução de permeabilização da membrana, composta por TRIS-HCl 10 mg/ml pH 7,2; EGTA 3 mg/ml, sacarose 50 $\mu\text{g/ml}$, digitonina 10 $\mu\text{mol/l}$ e o inibidor de protease PMSF, para impedir a degradação do citocromo c liberado. Em seguida, as células foram mantidas em gelo por 30 minutos para a permeabilização da membrana plasmática. As células foram centrifugadas a 10.000g por 10 minutos e o sobrenadante filtrado em membrana de PVDF 0,22 μm , tendo sua absorvância lida em 414 nm em leitor de microplacas (Epoch).

A concentração de citocromo c liberada foi calculada usando o ϵ de 100 $\text{mmol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$, e os resultados expressos em nmol de citocromo c liberado/mg proteína.

3.15 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Por possuir um tempo de meia vida curto a determinação da produção do óxido nítrico foi mensurada indiretamente pela dosagem dos seus produtos de degradação mais estáveis como o nitrito. Neste método, o nitrito primeiramente

reage com a sulfanilamida em meio ácido para formar um composto intermediário, o sal de diazônio. Em seguida, este sal reage com N-naftil-etilenodiamina (NED) formando um composto azo estável de coloração púrpura, cuja absorvância pode ser determinada em comprimento de onda de 550 nm (GREEN *et al.*, 1982).

Os macrófagos isolados da cavidade peritoneal foram plaqueados na densidade de 4×10^5 células/poço em placas de cultura de 96 poços. Aos macrófagos aderidos foram adicionados os tratamentos UX, AGb e AG nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$. Após os tempos de tratamento de 48 h, 100 μL do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços e adicionado 100 μL do reagente de Griess. o reagente de Griess foi preparado pela mistura de duas soluções na proporção 1:1, imediatamente antes do uso. A primeira solução era constituída por naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e a outra solução por sulfonamina *p*-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v). Após dez minutos, a absorvância foi medida em 550 nm, em leitor de microplacas. As concentrações de nitrito foram determinadas utilizando uma curva padrão de NaNO_2 (nas concentrações de 5, 10, 30 e 60 $\mu\text{mol/l}$). Como controle positivo da ativação da produção de óxido nítrico foi utilizado LPS na concentração de 100 ng/ml.

3.16 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS

A avaliação da produção de $\text{O}_2^{\bullet-}$ pelos macrófagos foi baseada no protocolo descrito por Sasada *et al.*, (1983). Neste procedimento, a presença de $\text{O}_2^{\bullet-}$ foi medida através da redução extracelular do citocromo c. Para a dosagem de $\text{O}_2^{\bullet-}$, 4×10^5 macrófagos/poço aderidos em placas de 96 poços foram incubados com o meio de reação composto por citocromo c (80 μM) em HBSS mais os tratamentos UX, AGb e AG nas concentrações 25, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$. Como controle positivo, os macrófagos foram incubados na presença de PMA (1 $\mu\text{g/ml}$).

Após 2 h de incubação a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio de reação foi transferido cuidadosamente para outra placa de 96 poços e a absorbância foi medida a 550 nm, em leitor de microplacas, utilizando como branco HBSS contendo citocromo c. As concentrações de O₂^{•-}, correspondente à concentração de citocromo c reduzido, foram determinadas utilizando o coeficiente de extinção molar ($C_{\text{oxid.red.}} \Delta \epsilon = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) : $C = A/\epsilon$ (JOHNSTON *et al.*, 1978) e os resultados foram expressos como a produção de ânion superóxido em $\mu\text{mol}/ 4 \times 10^5$ células.

3.17 FRACIONAMENTO BIOGUIADO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Para investigar os metabólitos secundários presentes nas cascas de *Endopleura uchi*, as cascas foram moídas e submetidas a extração em aparelho Soxhlet utilizando os seguintes solventes: hexano, diclorometano, metanol e água, originando as frações denominadas como HEX, DCM, MeOH, H₂O. O sobrenadante da precipitação etanólica do decocto (SUX) também foi utilizado para investigação dos metabólitos. De acordo com os resultados obtidos pelos dados de viabilidade celular em células CCRF-CEM, as frações mais ativas foram fracionadas, segundo os seguintes métodos:

3.17.1 Fracionamento em coluna sílica gel

A fração SUX foi solubilizada em metanol:água (1:1, 50 ml) e aplicada em uma coluna contendo sílica gel 60 (mesh 0,05-0,2). Diferentes solventes, com polaridades crescentes, foram eluídos através da coluna de acordo com Tabela 2.

Frações foram coletadas até que o eluato da coluna não apresentasse mais coloração. As frações foram coletadas, concentradas em evaporador rotatório e secas sob fluxo de nitrogênio. Após análise de TLC, testes de viabilidade celular em células CCRF-CEM foram realizados.

TABELA 2 – SOLVENTES UTILIZADOS NO FRACIONAMENTO DA AMOSTRA SUX

Solvente Silica gel mesh 60	Fração originadas
5:95 metanol:clorofórmio	1a
10:90 metanol:clorofórmio	1
20:80 metanol:clorofórmio	2
25:75 metanol:clorofórmio	3a
30:70 metanol:clorofórmio	3
40:60 metanol:clorofórmio	4
50:50 metanol:clorofórmio	5
60:40 metanol:clorofórmio	6
70:30 metanol:clorofórmio	7
80:20 metanol:clorofórmio	8
90:10 metanol:clorofórmio	9
100 metanol:clorofórmio	10
50:50 metanol:água	11
100 água	12

FONTE: O autor (2013).

3.17.2 Fracionamento por extração em fase sólida (*solid phase extraction*)

Para o fracionamento da amostra extraída com diclorometano foi utilizado a técnica de fracionamento em fase sólida (*solid phase extraction - SPE*). Nesta técnica, os analitos contidos numa matriz aquosa são extraídos após passarem por um cartucho contendo sorvente. A técnica foi realizada utilizando cartuchos WHATMAN de 12 ml contendo sílica como adsorvente. Primeiramente o cartucho foi condicionado eluindo 20 ml de acetonitrila na coluna. Após isso, a fração DCM

solubilizada em acetonitrila foi colocado gentilmente na coluna e permitiu-se que a amostra fosse adsorbida na coluna. Após esse processo, diferentes concentrações de metanol (20, 40, 80 e 100%) ou acetonitrila (10, 20, 40, 50, 60, 80, 90 e 100%). As frações foram coletadas, rotaevaporadas e secas sob fluxo de nitrogênio. Após análise de TLC, testes de viabilidade celular em células CCRF-CEM foram realizados.

3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância ANOVA (fator duplo ou fator único) e teste de Tukey, para comparação das médias. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão de no mínimo três experimentos, cada um em triplicata. Foram considerados estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS A PARTIR DO DECOCTO DAS CASCAS DO CAULE DE *E. uchi*

O chá de *E. uchi* é popularmente preparado a partir da decocção de cascas do caule. O chá foi preparado de acordo com seu uso tradicional e os polissacarídeos presentes no decocto foram precipitados com etanol originando um precipitado que foi coletado por centrifugação e seco em estufa a vácuo. Este processo foi repetido até que fossem obtidas quantidades suficientes de material para as etapas seguintes. Os polissacarídeos foram reunidos em uma única fração denominada AGb.

A fração AGb contém 57% de carboidrato total e 21% de proteína (Tabela 3) e representa 0,76 % (m/m) das cascas de *E. uchi*. A composição monossacarídica de AGb indicou que principal monossacarídeo foi Glc (35%), seguido de Rha (21%), Gal (16%), ácidos urônicos (14%) e Ara (7%), além de menores proporções de Xyl, Man e Fuc (Tabela 3).

A fração AGb apresentou um perfil multimodal por HPSEC, indicando a presença de diversos componentes (Figura 10).

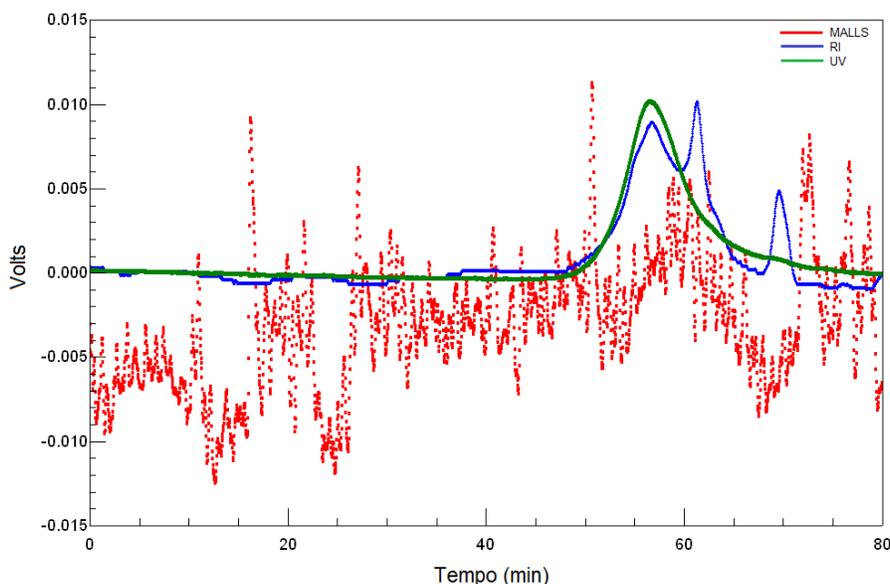


FIGURA 10 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC DO POLISSACARÍDEO BRUTO (AGb) OBTIDO DO DECOCTO DAS CASCAS DO CAULE DE *E. uchi*

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo, 90° indicado em vermelho; UV- detector de ultravioleta indicado em verde.

A fração AGb foi submetida a diversos tratamentos para purificação do polissacarídeo, conforme Figura 11.

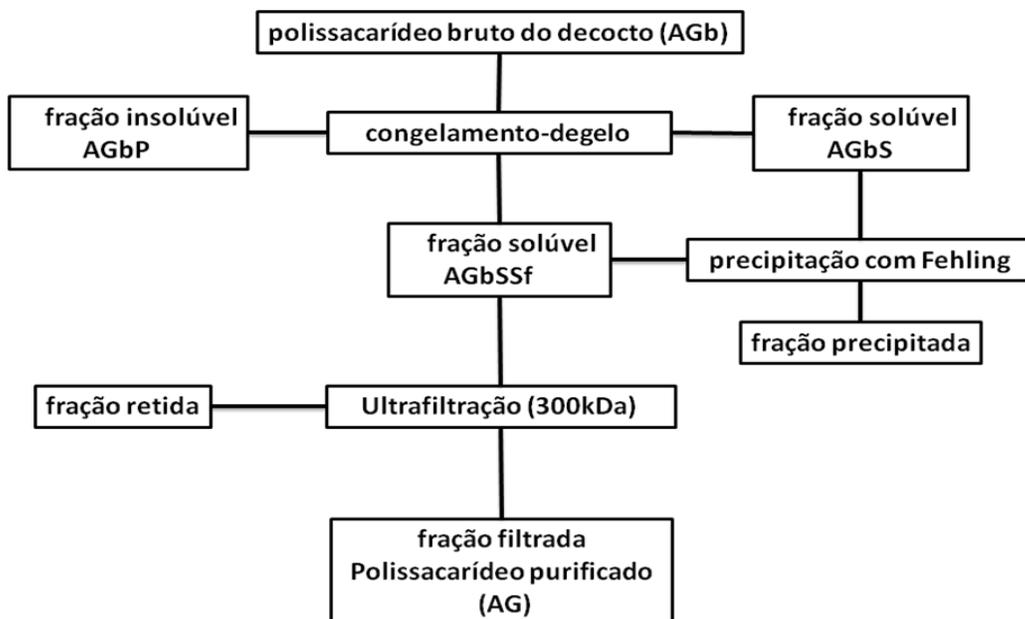


FIGURA 11 – FLUXOGRAMA REPRESENTANDO AS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS POR DECOÇÃO DAS CASCAS DO CAULE DE *E. uchi*

FONTE: O autor (2013).

Primeiramente, a amostra foi solubilizada e submetida ao processo de fracionamento por congelamento e degelo, que resultou num precipitado (AGbP) rico em glucose. Conforme mostrado na Tabela 3, a fração sóluvel (AGbS) apresentou diminuição do teor de glucose para cerca de 10% e um aumento nos teores de arabinose e galactose. A amostra AGbS, que contém os polissacarídeos solúveis em água fria, foi tratado com solução de Fehling. O componente sobrenadante da precipitação de Fehling após centrifugação (AGbSSf) continha galactose e arabinose como principais componentes (Tabela 3), sugerindo a presença de uma arabinogalactana. Todas as frações apresentaram perfis de eluição multimodais por HPSEC (Figura 12). Pode-se observar que o tratamento por congelamento/degelo eliminou um pico no sinal da amostra bruta, detectada pelo índice de refração, em torno de 60 min e o tratamento com Fehling removeu os picos eluindo no final do cromatograma, provavelmente picos de menor massa molar por não apresentarem detecção pelo espalhamento de luz e pelo alto tempo de retenção. Entretanto, a amostra AGbSSf ainda apresentava um perfil de eluição não homogêneo, indicando a necessidade de mais etapas de purificação.

TABELA 3 – RENDIMENTO, CONTEÚDO DE CARBOIDRATOS, PROTEÍNAS E COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DAS FRAÇÕES OBTIDAS DURANTE PROCESSO DE PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS OBTIDOS DO DECOCTO DAS CASCAS DO CAULE DE *E. uchi*

Frações	Rendimento ^b (%)	Açúcar total ^c (%)	Proteína ^d (%)	Composição Monossacarídica (%) ^a							
				Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^e
AGb	0,76	57	21	21,0	0,8	6,8	2,5	5,2	16,3	34,8	14,2
AGbS	0,26	53	18	24,9	0,6	14,5	3,7	8,5	22,8	10,1	14,8
AGbP	0,14	nd	nd	29,9	0,9	6,0	5,7	8,8	7,2	30,1	11,7
AGbSSf	0,25	54	17	13,5	0,7	27,7	2,2	2,8	31,9	9,7	12,2
AG	0,06	60	12	10,4	-	30,6	-	2,0	37,8	7,4	11,8

FONTE: O autor (2013).

^a açúcares neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis.

^b em relação as cascas de *E. uchi*

^c dosagem de açúcar total pelo método de DUBOIS *et al.* (1956)

^d dosagem de proteína pelo método de BRADFORD (1976)

^e dosagem de ácido urônico (AU) pelo método de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973)

nd: não determinado

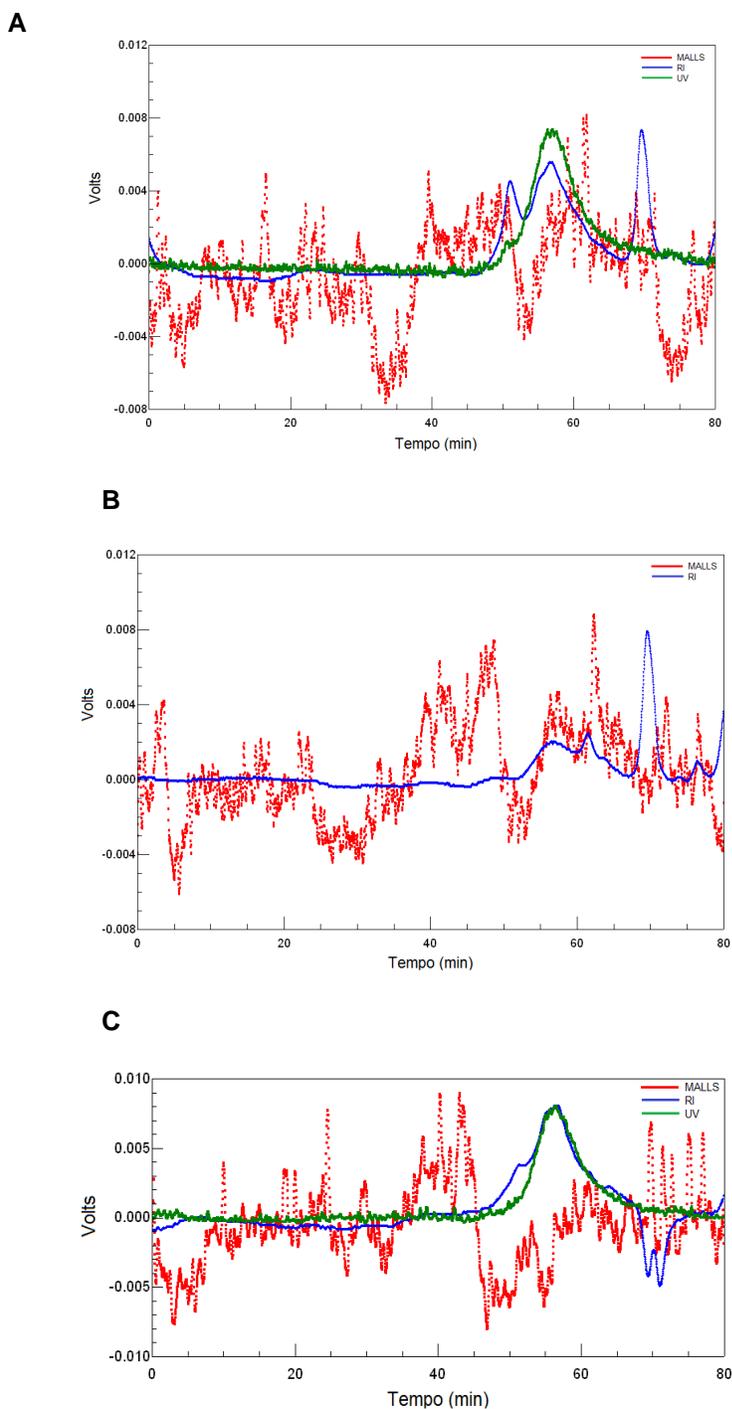


FIGURA 12 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC PARA AS FRAÇÕES (A) AGbS, (B) AGbP E (C) AGbSSf

FONTE: O autor (2013).

NOTA: RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo, 90° indicado em vermelho; UV- detector de ultravioleta indicado em verde.

A fração A**G**bSSf foi, então, submetida a ultrafiltração em membrana com limites de exclusão de 300 kDa e a fração eluída (A**G**) apresentou um perfil de eluição monomodal por HPSEC, indicando o isolamento de um polissacarídeo puro (Figura 13). A composição monossacarídica das amostras está mostrada na Tabela 3.

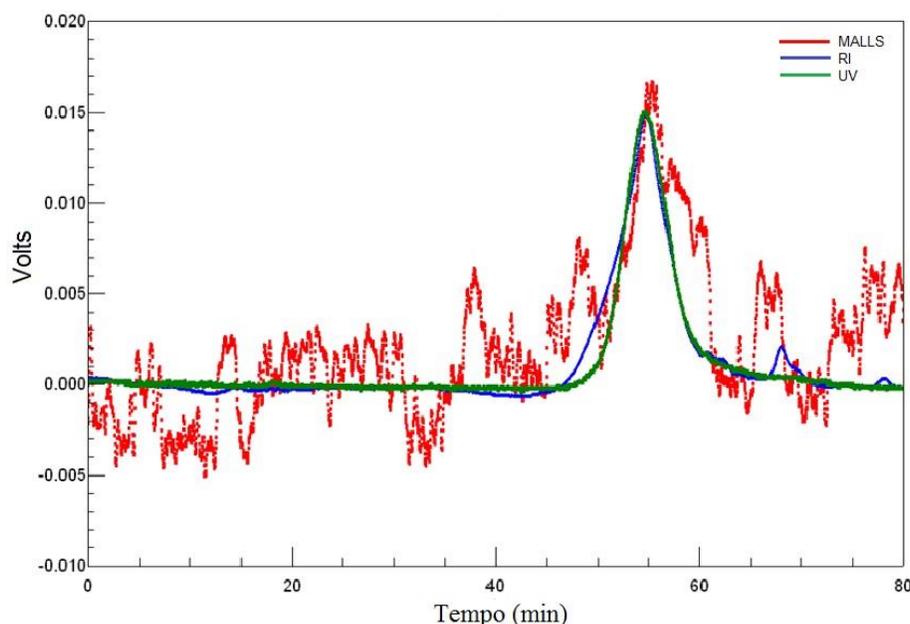


FIGURA 13 – PERFIL DE ELUIÇÃO POR HPSEC PARA A FRAÇÃO A**G** OBTIDA DOS PROCESSOS DE PURIFICAÇÃO DO POLISSACARÍDEO OBTIDO DO DECOCTO DAS CASCAS DE *E. uchi*

FONTE: O autor (2013).

NOTA: RI- detector diferencial de índice de refração indicado em azul; MALLS- detector de espalhamento de luz laser em multiângulos-ângulo, 90° indicado em vermelho; UV- detector de ultravioleta indicado em verde.

A fração A**G** apresentou 60% de carboidrato total e 12% de proteínas. O baixo teor de carboidrato total apresentado pela amostra pode ser explicado devido ao fato de ter-se utilizado galactose como curva padrão. Este polissacarídeo contém arabinose e galactose como monossacarídeos majoritários, e quantidades menores de ramnose, ácido urônico e glucose, indicando a presença de uma arabinogalactana. A relação molar arabinose:galactose:ramnose:ácido urônico é de 2,6:3,2:0,9:1.

Para identificação da identidade do ácido urônico, foi realizado a técnica de carboxi-redução. Neste processo o ácido urônico presente no polissacarídeo nativo é convertido ao seu respectivo açúcar neutro. A análise de carboxi-redução indicou que o ácido urônico presente em AG foi o ácido galacturônico, devido ao aumento da quantidade de galactose após hidrólise do polissacarídeo, conforme indicado pela Tabela 4.

TABELA 4 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO AG E DA FRAÇÃO AG APÓS CARBOXI-REDUÇÃO (AGc)

Composição monossacarídica ^a							
Frações	Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	AU ^b
AG	10,4	30,6	tr	2,0	37,8	7,4	11,8
AGc	11,0	31,8	1,4	2,1	45,5	6,2	2,0

FONTE: O autor (2013).

tr = traços

^a açúcares neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis.

^b dosagem de ácido urônico pelo método de BLUMENKRANTZ e ASBOE-HANSEN (1973)

A presença de 12% de proteínas na amostra, além da coeluição do pico do detector de ultravioleta no perfil de HPSEC, o qual detecta proteínas, com os picos dos detectores de espalhamento de luz e índice de refração indicam que a proteína pode estar ligada a arabinogalactana, o que indicaria a presença de uma arabinogalactana do tipo II, já que estas podem estar associadas a proteínas, ao contrário das arabinogalactanas do tipo I (FINCHER; CLARKE; STONE, 1983).

A fração AG também foi analisada por espectroscopia de infra-vermelho (Figura 14). O espectro apresentou bandas em 1148, 1075 e 1043 cm^{-1} . KACURAKOVÁ *et al.* (2000) mostraram que as arabinogalactanas apresentam bandas principais em 1156, 1078 e 1040 cm^{-1} . De acordo com os autores, as bandas de galactanas β -(1→6)- or β -(1→3) ligadas ocorrem entre 1078-1072 cm^{-1} , enquanto as bandas das cadeias laterais de arabinanas são encontradas em torno de 1044 cm^{-1} . A fração AG também apresentou uma banda intensa em 1610 cm^{-1} , a qual pode ser atribuída à presença de proteína, provavelmente associada ao polissacarídeo. A região em torno de 1650 cm^{-1} é característica da presença de

proteínas. Esta banda é atribuída principalmente ao estiramento C=O da ligação peptídica. No entanto, a presença de ácidos urônicos, devido a presença do grupo carboxílico, interfere deslocando esta banda de proteína em direção a 1600 cm^{-1} (BOULET; WILLIAMS; DOCO, 2007). Estes resultados corroboram a sugestão de presença de uma arabinogalactana do tipo II.

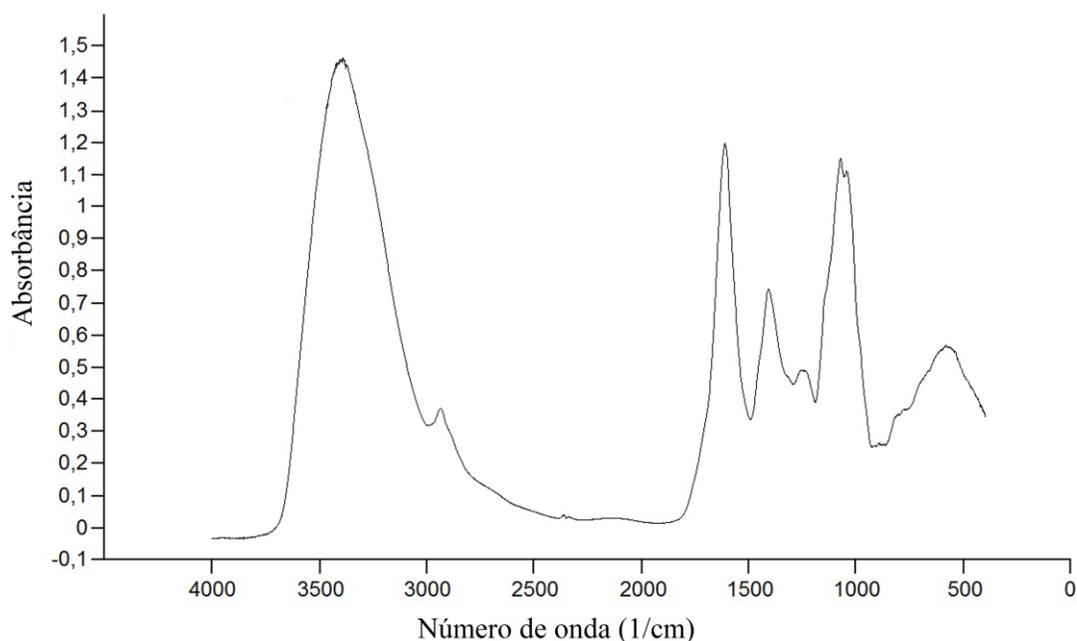


FIGURA 14 – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO AG.
FONTE: O autor (2013).

O espectro de ressonância magnética nuclear de carbono 13 (RMN- ^{13}C) de AG (Figura 15) mostrou vários sinais na região de C-1 (δ 99,3 . 109,1) e sinais típicos de arabinogalactanas do tipo II. O sinal do grupo carboxílico das unidades de ácido urônico foi observado em δ 174,3. Sinais em δ 106,9, 107,6, e 109,1 foram atribuídos ao C-1 de unidades de α -L-Araf (DELGOBO *et al.*, 1998; REDGWELL *et al.*, 2011), e aqueles em δ 103,2 e 102,7 ao C-1 das unidades de β -D-Galp (DELGOBO *et al.*, 1998; CIPRIANI *et al.*, 2006). Os sinais em δ 16,8 e 99,1 foram atribuídos ao CH₃-6 e ao C-1 das unidades de α -L-Rhap, respectivamente (GORIN e MAZUREK, 1975; PELLERIN *et al.*, 1995). O sinal em δ 97,7 pode ser atribuído as unidades de α -D-Glcp. As arabinogalactanas do tipo II são formadas por cadeias curtas de (1→3) e (1→6) β -D-galactanas unidas umas

às outras por pontos de ramificação em O-3 e O-6. Os sinais em δ 82,2 and 71,2 correspondem ao C-3 e C-6 das unidades de β -D-Galp (1 \rightarrow 3) e (1 \rightarrow 6) ligadas, respectivamente (PELLERIN *et al.*, 1995; REDGWELL *et al.*, 2011).

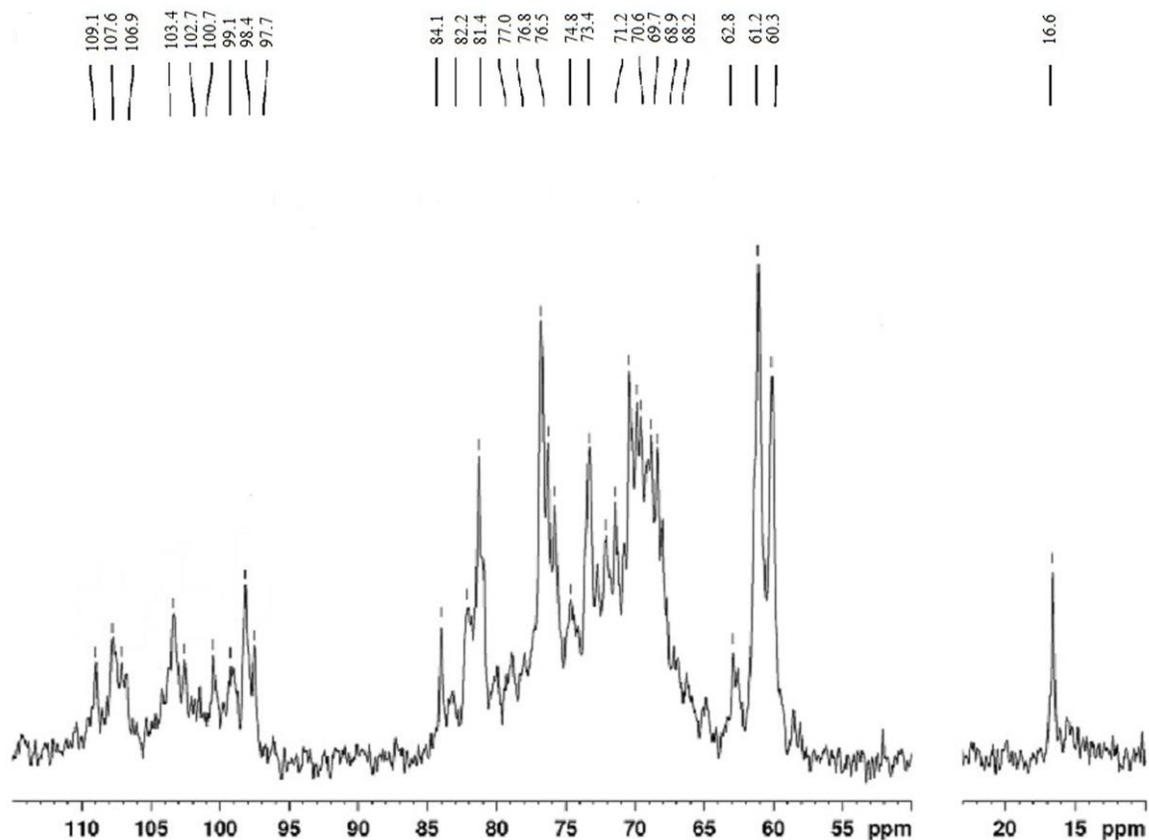


FIGURA 15 – ESPECTRO DE RMN- ^{13}C DA FRAÇÃO AG.
 FONTE: O autor (2013).

Para confirmar o tipo de arabinogalactana presente na fração AG foi realizada a metilação da amostra. Entretanto, a metilação de polissacarídeos contendo ácidos urônicos pode levar a β -eliminação em meio fortemente alcalino e subsequente degradação por hidrólise ácida (HILLESTAD; WOLD; ENGEN, 1977). Por isso, devido a presença de ácidos urônicos na fração, foi realizado inicialmente a carboxi-redução da amostra. Para a metilação foi utilizado NaBD₄ no processo de carboxi-redução. Com o uso deste composto, os monossacarídeos neutros originados a partir dos ácidos urônicos se apresentam com 2 unidades de massa a mais em C-6 quando comparados aos monossacarídeos neutros pré-

existentes no polímero e isto pode ser observado pelos perfis de fragmentação dos monossacarídeos nas análises de GLC-MS (CARPITA; SHEA, 1989).

A análise de metilação confirmou que a fração AG consiste de uma arabinogalactana do tipo II (Tabela 5). A análise de metilação mostrou que AG que as unidades de galactopiranosose 3-O-, 3,6-di-O-, e 6-O- substituídas, em acordo com os derivados metilados 2,4,6-Me₃-Gal (8,6%), 2,4-Me₂-Gal (30%), e 2,3,4-Me₃-Gal (4,1%), respectivamente. Estes derivados indicam que AG é uma arabinogalactana do tipo II, já que arabinogalactanas do tipo II são formadas por cadeias de (1→3) (1→6) β-galactanas e as arabinogalactanas do tipo I são constituídas por D-galactopiranosose unidas por ligações β-(1→4) (CARPITA; McCANN, 2000). Além disso, AG contém terminais não-redutores de Araf (2,3,5-Me₃-Ara) (17,7%) e Galp (2,3,4,6-Me₄-Gal) (7,5%). Esta unidade de galactose apresentou o íon 207 indicando um acréscimo de massa de 2 unidades proveniente da redução com NaBD₄ já que o íon 205 seria o esperado no carbono 6 das hexoses. Unidades de Glcp também estão presentes na forma de terminais não-redutores, como mostrado pela presença do derivado 2,3,6-Me₃-Glc (6,4%). As unidades de arabinose são substituídas em O-5 e O-3, de acordo com os derivados 2,3-Me₂-Ara (11,7%), e 2,5-Me₂-Ara (4,7%), respectivamente. A presença do derivado metilado 3,4-Me₂-Rha (9,2%) indica a presença de unidades de 2-O-Rhap, provavelmente substituídas por terminais de Glcp, Araf ou GalpA.

Os resultados apresentados sugerem que AG é uma arabinogalactana do tipo II contendo uma cadeia principal de unidades de β-Galp (1→3)-ligadas, substituídas em O-6 por cadeias laterais de β-Galp (1→6)-ligadas. As cadeias laterais são substituídas em O-3 por cadeias de α-Araf (1→5) e (1→3)-ligadas, as unidades de ramnose estão (1→2) ligadas e são provavelmente substituídas por terminais não redutores de Araf, Glcp e GalpA. De acordo com perfil de eluição por HPSEC, este polissacarídeo está provavelmente ligado a proteína, indicando a presença de uma arabinogalactana proteína (AGP).

TABELA 5 – ACETATO DE ALDITÓIS PARCIALMENTE METILADOS OBTIDOS POR METILAÇÃO DA AMOSTRA AG CARBOXI-REDUZIDA

Derivado metilado	ligações	mol% ^a
2,3,5-Me ₃ -Ara	terminal	17,7
3,4-Me ₂ -Rha	2-	9,2
2,5-Me ₂ -Ara	3-	4,7
2,3,4,6-Me ₄ -Glc	terminal	6,4
2,3-Me ₂ -Ara	5-	11,7
2,3,4,6-Me ₄ -Gal	terminal	7,5
2,4,6-Me ₃ -Gal	3-	8,6
2,3,4-Me ₃ -Gal	6-	4,1
2,4-Me ₂ -Gal	3,6-	30,0

FONTE: O autor (2013).

^a açúcares neutros analisados por GLC-MS, na forma de acetatos de alditóis parcialmente metilados.

A massa molar (Mw) do polissacarídeo calculada a partir do valor do dn/dc (0,136) foi de $1,09 \times 10^5$ g/mol. De acordo com Showalter (1993) a massa molar das AGPs é bastante heterogênea entre as espécies de plantas devido a diferentes graus de glicosilação destas moléculas. Uma arabinogalactana isolada de *Centella asiatica* contendo uma fração péctica apresentou um massa molar de $5,4 \times 10^5$ g/mol e após tratamento enzimático para remoção da pectina a massa molar mudou para $4,1 \times 10^5$ g/mol (WANG *et al.*, 2005). Arabinogalactanas de menor massa molar já foram descritas para as isoladas das folhas de *Maytenius ilicifolia* e *Artemisia absinthium* que apresentaram massas molares de 11.400 e 84.160 g/mol, respectivamente (CIPRIANI *et al.*, 2006; FERREIRA, 2012). Por outro lado, arabinogalactanas de maior massa molar já foram descritas como, por exemplo, a isolada do caule de *Tinospora cordifolia* que apresentou uma massa molar de $2,2 \times 10^6$ g/mol (CHINTALWAR *et al.*, 1999).

Diversos autores isolaram arabinogalactanas a partir de cascas de diferentes espécies vegetais por extrações aquosas (DETERS *et al.*, 2001; ZIPPEL; DETERS; HENSEL, 2009; ZHU *et al.*, 2009), além de outras partes como frutos (GANE *et al.*, 1995), flores (QIN *et al.*, 2012) , raízes (CANNENSAN *et al.*, 2012) e folhas (FERREIRA, 2012).

De acordo com a literatura, as cadeias laterais das arabinogalactanas podem terminar em α -L-arabinofuranose (L-Araf) e outros monossacarídeos como Fucp, Rhap and GlcpA (contendo ou não 4-O-metil) (GASPAR *et al.*, 2001). Os resultados deste trabalho mostram que a arabinogalactana isolada de *E. uchi* possui terminais redutores de Glcp, Araf ou GalpA, os quais que também foram observados como terminais redutores na arabinogalactana proteína isolada de *Lycium barbarum* (REDGWELL *et al.*, 2011). Por outro lado, a arabinogalactana isolada da infusão das folhas de *Maytenus ilicifolia* apresentou somente α -L-Araf e 4-O-Me-GlcpA como terminais redutores. E das folhas de *Artemisia absinthium*, uma arabinogalactana proteína apresentou Ara, Gal, Man e ácido glucurônico como terminais redutores (FERREIRA, 2012). Na literatura, as unidades de ácido urônico, quando determinandas, normalmente são identificados como de GlcpA (CIPRINANI *et al.*, 2006; BRECKER *et al.*, 2005; THUDE; CLASSEN, 2005). A arabinogalactana de *E. uchi* apresenta característica peculiares já que o polímero apresenta unidades de GalpA como ácido urônico. Além disso, a arabinogalactana de *E. uchi* também contém unidades de Rhap, entretanto estas não foram encontradas como terminal redutor, mas O-2 substituídas. Esta característica também foi observada para as arabinogalactanas de vinho tinto (PELLERIN *et al.*, 1995) e de cultura celular de *Echinacea purpurea* (WAGNER *et al.*, 1988).

Devido as diversas atividades biológicas atribuídas as arabinogalactanas, o polissacarídeo bruto (AGb), o polissacarídeo purificado (AG), além do decocto (UX), foram analisados quanto a seus potenciais efeitos anti-tumoral e imunomodulatório.

4.2 EFEITO DO DECOCTO (UX) E DOS POLISSACARÍDEOS (AGb E AG) DE *E. uchi* SOBRE CÉLULAS HeLa

Um dos usos do decocto de *Endopleura uchi* na medicina popular é a sua utilização contra miomas uterinos. Entretanto, não há dados científicos que comprovem a eficácia do chá contra miomas uterinos. Dessa forma, decidiu-se avaliar o efeito do decocto das cascas de *E. uchi* (UX) utilizando como modelo células de adenocarcinoma uterino humano (células HeLa). Além disso, foram avaliados se os polissacarídeos isolados também poderiam contribuir para um possível efeito citotóxico.

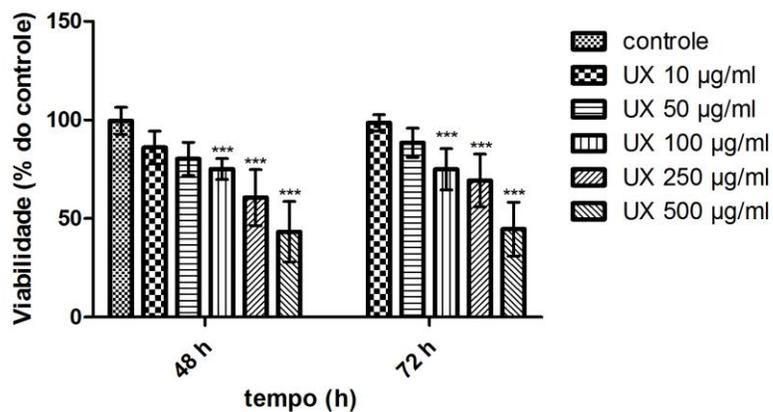
4.2.1 Viabilidade celular

Inicialmente o decocto das cascas do caule de *E. uchi* (UX) e os polissacarídeos do decocto (AGb e AG) foram avaliados quanto a citotoxicidade em relação às células HeLa para determinar as concentrações a serem utilizadas nos demais experimentos. Para tanto, foram testadas as concentrações de 10 a 500 µg/ml para UX e de 5 a 500 µg/ml para AGb e AG nos tempos de 48 e 72 h. Os resultados estão apresentados na Figura 16. O método utilizado foi o do cristal violeta.

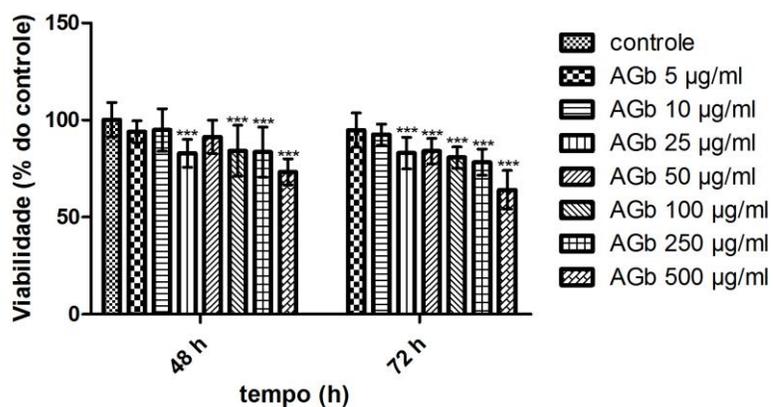
Na figura 16A observa-se que o decocto (UX) reduziu a viabilidade celular de maneira dose dependente em 48 e 72 h. Na dose de 100 µg/ml a diminuição da viabilidade foi de 25% em ambos tempos de tratamento. Já na dose mais alta (500 µg/ml) a inibição foi de 57 e 56% em 48 e 72 h, respectivamente. Já AGb e AG (Figura 16B e 16C) apresentaram um efeito que não foi dose nem tempo dependente. A inibição foi de aproximadamente 20% para as concentrações a partir de 25 µg/ml.

Dessa forma, foram escolhidas para os demais experimentos concentrações entre 50 e 250 µg/ml, tanto para o decocto (UX) quanto para os polissacarídeos (AGb e AG).

A



B



C

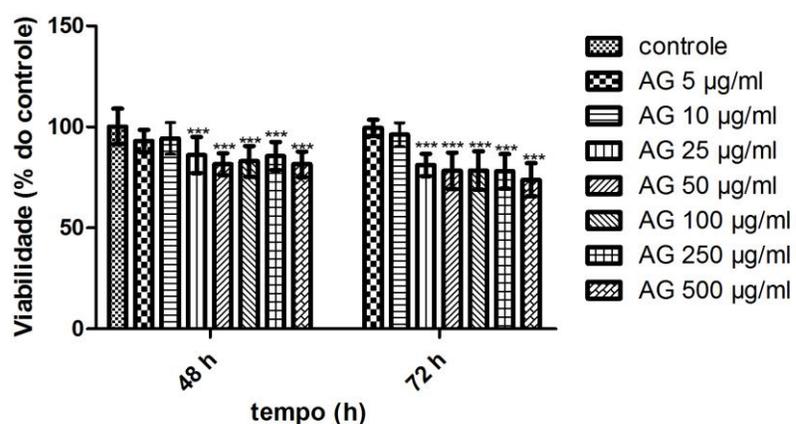


FIGURA 16 – EFEITO DE UX, AGb E AG SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HeLa
 FONTE: O autor (2013).

NOTA: A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do cristal violeta após tratamento com UX nas concentrações de 10 a 500 µg/mL (A) e AGb (B) e AG (C) nas concentrações de 5 a 500 µg/mL nos tempos de 48 e 72 h. O grupo controle representa o grupo tratado apenas com o meio de cultura. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 5 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle

4.2.2 Proliferação celular

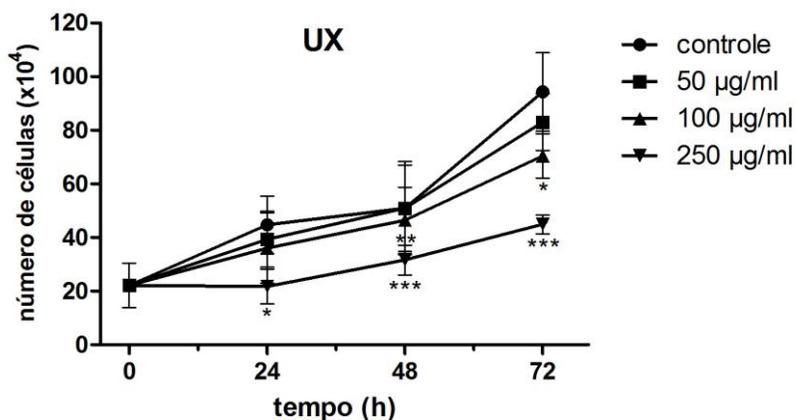
A proliferação das células HeLa tratadas com UX, AGb e AG em diferentes tempos, foi avaliada utilizando-se o método de exclusão do corante azul de Tripán pelas células viáveis. Este método avalia a integridade da membrana plasmática: as células que são permeáveis ao corante possuem comprometimento na permeabilidade da membrana, sendo consideradas células não viáveis, e aquelas que não apresentam coloração são consideradas viáveis.

Para este ensaio foram utilizadas as concentrações de 50, 100 e 250 µg/ml para UX, AGb e AG. Os resultados estão mostrados na Figura 17. Na dose de 250 µg/ml, em 24 h, UX inibiu a proliferação celular em 52% em relação ao controle. Em 48 h, as doses de 100 e 250 µg/ml inibiram o crescimento celular em 38 e 58%, respectivamente, enquanto em 72 h, esta inibição foi de 25 e 52% em relação ao controle.

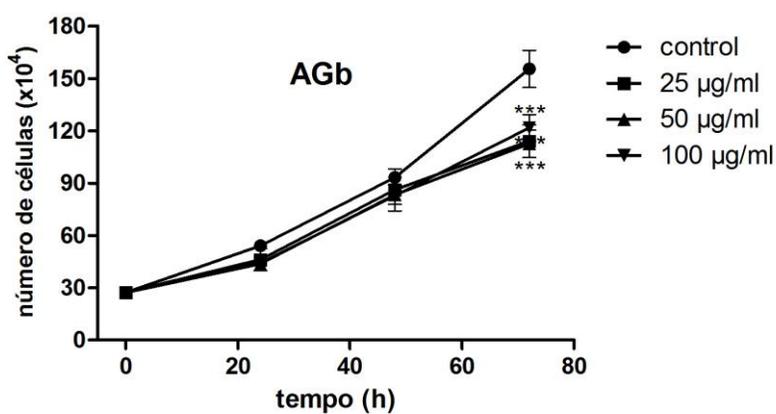
AGb inibiu o crescimento celular somente no tempo de 72 h em aproximadamente 25% em relação ao controle. Já AG promoveu inibição em 48 e 72 h. No tempo de 48 h, a inibição foi de aproximadamente 15% enquanto que em 72 h inibição foi de 25%.

Os resultados dos experimentos de viabilidade e proliferação celular sugerem que os polissacarídeos presentes na decocto das cascas do caule de *E. uchi* podem ser parcialmente responsáveis pela atividade citotóxica apresentada pelo decocto (UX), já que as frações polissacarídicas (AGb e AG) apresentaram uma redução na viabilidade e na proliferação de células HeLa de aproximadamente 20% em todas as doses testadas, enquanto o decocto (UX) promoveu uma redução muito maior na viabilidade e proliferação, sendo que esta inibição é maior que 50% nas maiores doses testadas. Estes resultados indicam que o decocto apresenta alguma molécula de baixa massa molecular que provavelmente possui atividade citotóxica.

A



B



C

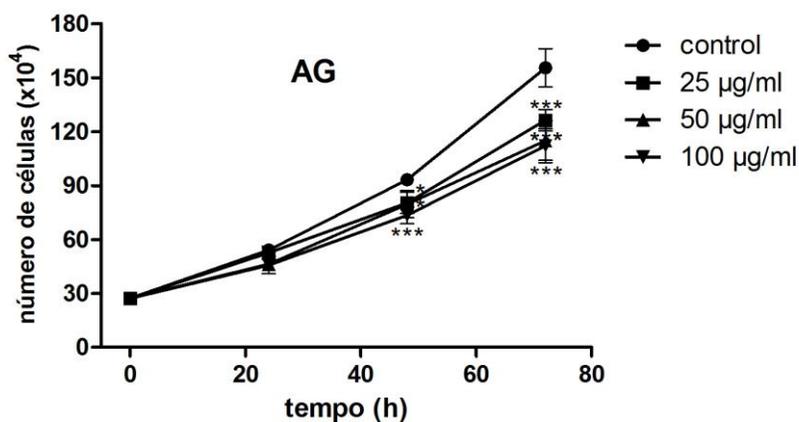


FIGURA 17 – EFEITO DE UX, AGb E AG SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE CÉLULAS HeLa
 FONTE: O autor (2013).

NOTA: A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do cristal violeta após tratamento com UX (A) e AGb (B) e AG (C) nas concentrações de 50, 100 e 250 µg/mL nos tempos de 24, 48 e 72 h. O grupo controle representa o grupo tratado apenas com o meio de cultura. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Além disso, os resultados obtidos para o polissacarídeo bruto (AGb) e para o polissacarídeo purificado (AG) foram muito semelhantes, indicando que a arabinogalactana isolada pode ser o polissacarídeo que possui atividade biológica, responsável pela diminuição da viabilidade e proliferação de células HeLa.

A infusão das folhas de *Artemisia vulgaris* e *Artemisia absinthium*, plantas utilizadas na medicina popular, também são capazes de afetar a proliferação de células leucêmicas THP-1. Após 48 h de tratamento, as infusões de *A. vulgaris* e de *A. absinthium*, na concentração de 500 µg/ml, reduziram o número de células leucêmicas em 40,5% e 25,4%, respectivamente (FERREIRA, 2012). O extrato aquoso da planta *Pereskia bleo* apresentou um significativo efeito antiproliferativo em células 4T1 (câncer mamário de camundongos) e NIH/3T3 (fibroblastos de camundongos) nas doses de 200 e 300 µg/ml. Já o extrato metanólico da mesma planta não apresentou efeito citotóxico nestas linhagens celulares (ER; CHENG; RADHAKRISHNAH, 2007). A infusão de *Uncaria tomentosa*, popularmente conhecida como unha-de-gato, apresentou citotoxicidade maior que 90% em células HeLa nas doses de 120 e 240 mg/ml (DE MARTINO *et al.*, 2006).

Alguns polissacarídeos já foram descritos por apresentarem atividade antitumoral, conforme mostrado por ensaio de viabilidade e proliferação celular.

Em linhagens de célula de câncer de cérvix uterino (HeLa) foi demonstrado que uma arabinoglucana isolada de *Angelica sinensis*, contendo uma cadeia principal composta de unidades de glucose α -(1→4) ligadas com ramificações de unidades de glucose α -(1→6) possuindo terminais redutores β -D-arabinofuranose, diminuiu a viabilidade celular, de maneira dose dependente, nas concentrações de 3 a 100 µg/ml (CAO *et al.*, 2006). Um polissacarídeo isolado de *Crocus sativus* contendo Rha, Fuc, Ara, Xyl, Gal, Glc e 5,5% de proteína, também apresentou atividade contra células HeLa, sendo a inibição dose dependente e o IC₅₀ de aproximadamente 9 µg/ml (ESCRIBANO *et al.*, 1999). SILVEIRA (2010) observou que a ramnogalactana ácida de *Chorisia speciosa* afetou de maneira discreta a viabilidade de células HeLa promovendo uma inibição de aproximadamente 10% nas doses de 100 e 200 µg/ml. %.. A mesma autora

verificou que uma xiloglucana isolada das sementes de *Hymenaea courbaril* não afetou a viabilidade de células HeLa.

HUNG *et al.* (2012) isolaram uma fração polissacarídica de *Zizyphus jujuba* contendo Rha, Ara, Xyl, Man, Glc e Gal na relação molar de 2,2:7,8:1,2:0,2:1,4:3,8. Os autores demonstraram que esta fração foi capaz de diminuir a viabilidade de células de melanoma de uma maneira dose dependente, com doses variando de 2,5 a 5 mg/ml pelo tempo de 24 e 48 h de tratamento. Na dose mais alta (5 mg/ml) no tempo de 48 h, a inibição foi de 87. Um complexo polissacarídeo-proteína isolado de *Lycium barbarum* apresentou atividade antiproliferativa as linhagens de hepatocarcinoma QGY7703 e leucêmica humana HL-60 de maneira dose dependente em concentrações variando de 50 a 1000 µg/ml (GAN; WANG; ZHANG, 2001; ZHANG *et al.*, 2005). Os efeitos antiproliferativos de quatro frações polissacarídicas isoladas de *Ginkgo bilboa*, constituídas majoritariamente de Rha, Glu e Gal, foram testadas em células da linhagem de câncer gástrico (AGS e SGC) e leucemia (U937). Os efeitos sobre AGS foi dose dependente e os polissacarídeos de menor massa foram mais efetivos do que o de maior massa. Na concentração de 640 µg/ml a inibição pelo polissacarídeo de maior e menor massa foi de 16 e 51%, respectivamente. O polissacarídeo de maior massa, quando acetilado, reduziu a fortemente a viabilidade celular de células U937, chegando a uma redução na viabilidade de 80% na concentração de 640 µg/ml. (WU *et al.*, 2011).

4.2.3 Análise de ciclo celular

Com base nos resultados obtidos, a próxima etapa foi verificar o efeito das amostras UX, AGb e AG sob o ciclo celular. Este ensaio permite, avaliar parada de proliferação em uma determinada fase do ciclo celular, além de permitir uma estimativa da frequência daquelas que se encontram em morte celular, que se caracterizam pelo conteúdo de DNA fragmentado (indício de apoptose).

Basicamente, o ciclo celular consiste de uma fase de replicação do DNA (fase S) seguido da segregação dos cromossomos replicados nas células filhas na fase M. Há ainda duas fases de intervalo (*gaps*) denominadas fases G1 e G2. Esta fase de há um recolhimento de informações para determinar se a célula pode ou não entrar nas fases S ou M do ciclo (NOBURY; NURSE, 1992). A técnica baseia-se na capacidade do intercalante de DNA, o Iodeto de propídeo (PI), emitir uma fluorescência que pode ser quantificada. Dessa forma, quanto maior a quantidade de DNA na amostra em questão, maior a fluorescência medida. Selecionado o gráfico de histograma é possível separar as diferentes fases do ciclo por meio de picos característicos (DARZYNKIEWICZ, 2010).

A amostra UX na concentração de 100 e 250 µg/ml e as amostras AG e AGb nas concentrações de 50 e 100 µg/ml no tempo de 72 h foram avaliadas quanto a seus possíveis efeitos sobre o ciclo celular. Os histogramas obtidos das análises de citometria de fluxo estão mostrados na Figura 18. A partir destes foi possível separar as fases do ciclo celular: fase sub-G1 (com conteúdo de DNA fragmentado), fase G1 e fase S-G2.

O tratamento com AG e AGb não foi capaz de provocar mudanças na progressão do ciclo celular das células HeLa, nas condições experimentais. Já o decocto das cascas do caule de *E. uchi* (UX), na dose de 250 µg/ml, apresentou um aumento na fase sub G1 do ciclo celular de 7% (controle) para 14% (UX 250 µg/ml). Concomitantemente, houve uma diminuição da fase G1 de 63% (controle) para 58% (UX 250 µg/ml), conforme demonstrado na figura 19. Um aumento na fase G1 ou G2/S do ciclo indicaria uma parada no ciclo celular, enquanto um aumento na fase sub G1 indica um aumento na fragmentação do DNA, uma característica de células em apoptose.

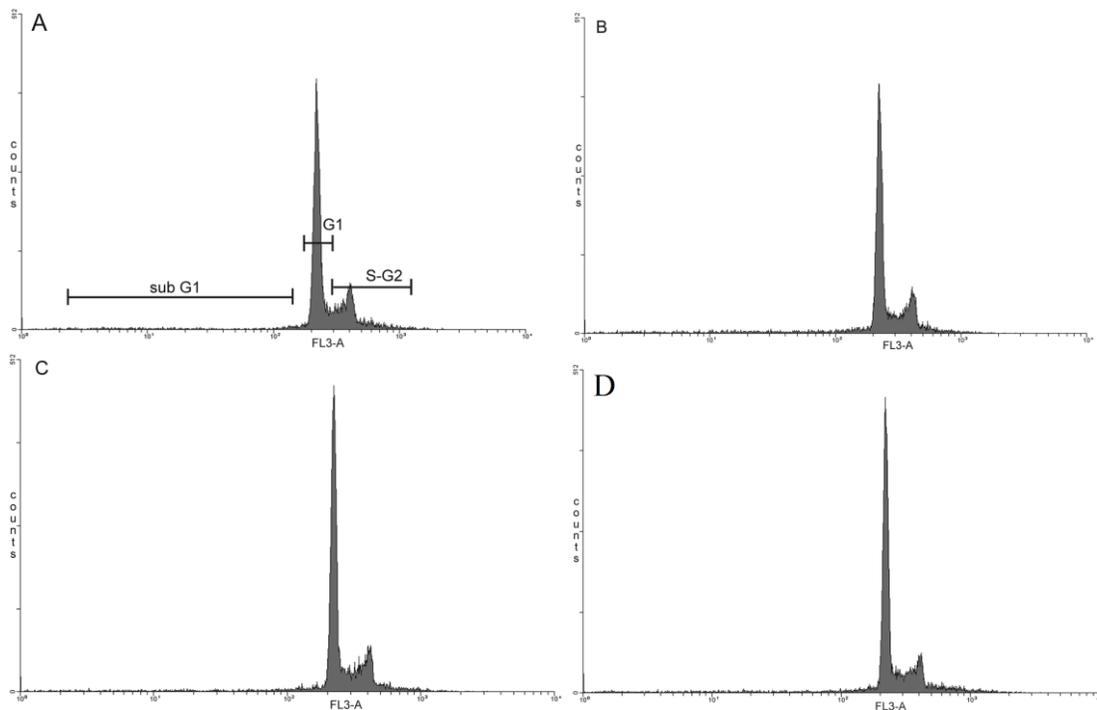


FIGURA 18 - HISTOGRAMAS REPRESENTATIVOS DA ANÁLISE DE CICLO CELULAR DE CÉLULAS HeLa TRATADAS COM UX, AGb e AG.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Histogramas representativos de células células tratadas com UX, AGb e AG pelo período de 72h. (A) condição controle (ausência do tratamento); (B) células tratadas com 250 µg/mL de UX; (C) células tratadas com 100 µg/mL de AGb e (D) células tratadas com 100 µg/mL de AG. As regiões delimitadas nos histogramas correspondem a fase sub-G1, fase G1 e fases S-G2.

Outros extratos obtido por infusão ou decocção de plantas utilizadas na medicina popular podem afetar o ciclo celular, promovendo parada no ciclo celular ou dando indícios de morte celular. A infusão das folhas de *Artemisia vulgaris* na concentração de 500 µg/ml interferiu na progressão do ciclo celular de células THP-1, devido ao aumento significativo na proporção de células na fase sub-G1 e G2/M do ciclo, reduzindo proporcionalmente a fase G1 (FERREIRA, 2012). Este extrato também aumentou a porcentagem de células na fase sub-G1 de 4,4% (controle) para 9,2%. O decoto das raízes da planta *Bryonia dioica* também promoveu um aumento na porcentagem de células leucêmicas BL41 na fase sub G1 de 2,7 para 15,7%, indicando que o extrato promove apoptose, o que foi confirmado posteriormente por análises de marcação com anexina V, potencial de

membrana mitocondrial e clivagem de caspases (BENARBA; MEDAHH; AOUES, 2012)

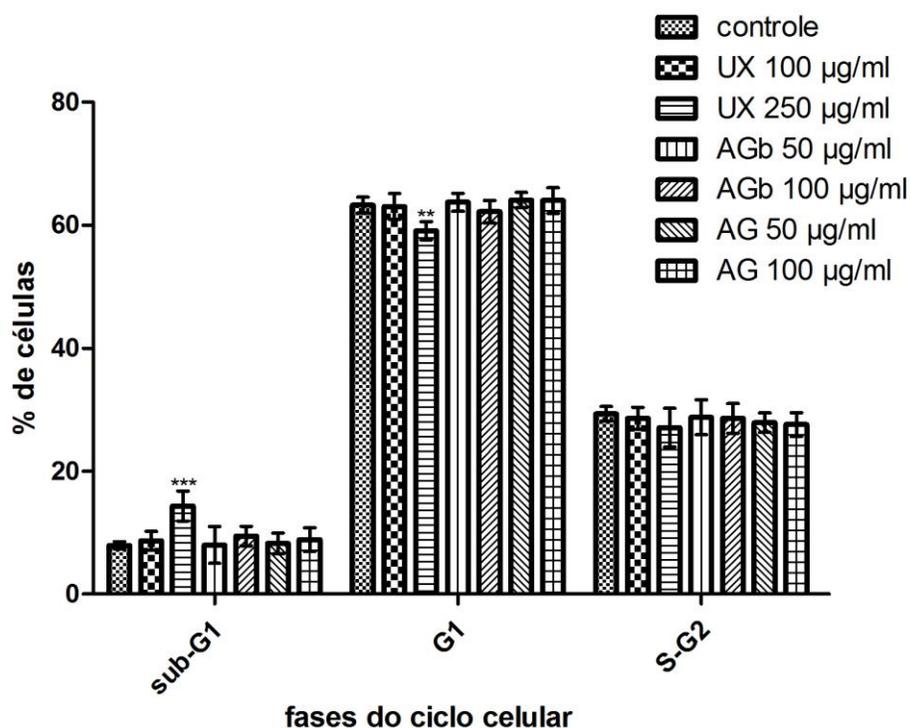


FIGURA 19 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS HeLa EM CADA FASE DO CICLO CELULAR APÓS TRATAMENTO COM UX, AGb e AG.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Análise do ciclo celular de células HeLa após tratamento com UX nas concentrações de 100 e 250 µg/ml e AGb e AG nas concentrações de 50 e 100 µg/ml por 72 h. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Alguns polissacarídeos foram descritos como capazes de afetar a progressão do ciclo celular em linhagens de células tumorais. Polissacarídeo isolado de *Zizyphus jujuba*, provocou uma diminuição de células de melanoma na fase G1, com concomitante aumento na fase G2/M. A porcentagem de células de melanoma na fase G2/M do ciclo aumentou de 14% (controle) para 42% (tratamento com 5 mg/ml). (HUNG *et al.*, 2012). Uma ramnogalacturonana do tipo I de *Abelmoschus esculentus* também foi capaz de aumentar a porcentagem de

células de melanoma B16F10 na fase G2/M do ciclo celular (VAYSSADE *et al.*, 2010). Ainda, foi demonstrado que o polissacarídeo de sementes de *Ginkgo biloba*, composto majoritariamente de manose, provocam uma diminuição no número de células SMMC-7721 na fase G2/M de 17% (controle) para 11% no tratamento com 500 µg/ml e um aumento nas células em apoptose de 3 para 9%, indicando um efeito antiproliferativo (CHEN *et al.*, 2002). CAO *et al.* (2010) mostram que o tratamento de células HeLa com a arabinoglucana de *Angelica sinensis* nas concentrações de 30, 100 e 300 µg/ml resultou em acúmulo de células na fase S (29, 33 e 34%, respectivamente) quando comparadas ao controle (22%). Além disso, a porcentagem de células na fase sub-G1 do ciclo também foi aumentada.

4.2.4 Morfologia celular

As amostras UX, AGb e AG foram avaliadas quanto seus efeitos sobre a morfologia das células HeLa. Na Figura 20 estão apresentadas as fotomicrografias das culturas de células HeLa, observadas por microscopia óptica, tratadas por 72 h. No controle (Figura 19A), observam-se características epiteliais, citoplasma basófilo e núcleos grandes com um ou mais nucléolos, como é próprio dessa linhagem (SKLOOT, 2007). Os elementos celulares encontram-se justapostos, constituindo uma monocamada contínua, sendo estes os aspectos normais da monocamada celular.

Na cultura tratada com a concentração de UX 250 µg/ml, observam-se alterações na morfologia: perda da monocamada celular, menor relação núcleo/citoplasma e condensação da cromatina, características de células apoptóticas. AGb e AG promoveram apenas discretas alterações na morfologia celular, quando comparada a UX e somente na concentração de 250 µg/ml. Estes dados corroboram a idéia de que UX promove a apoptose de células HeLa.

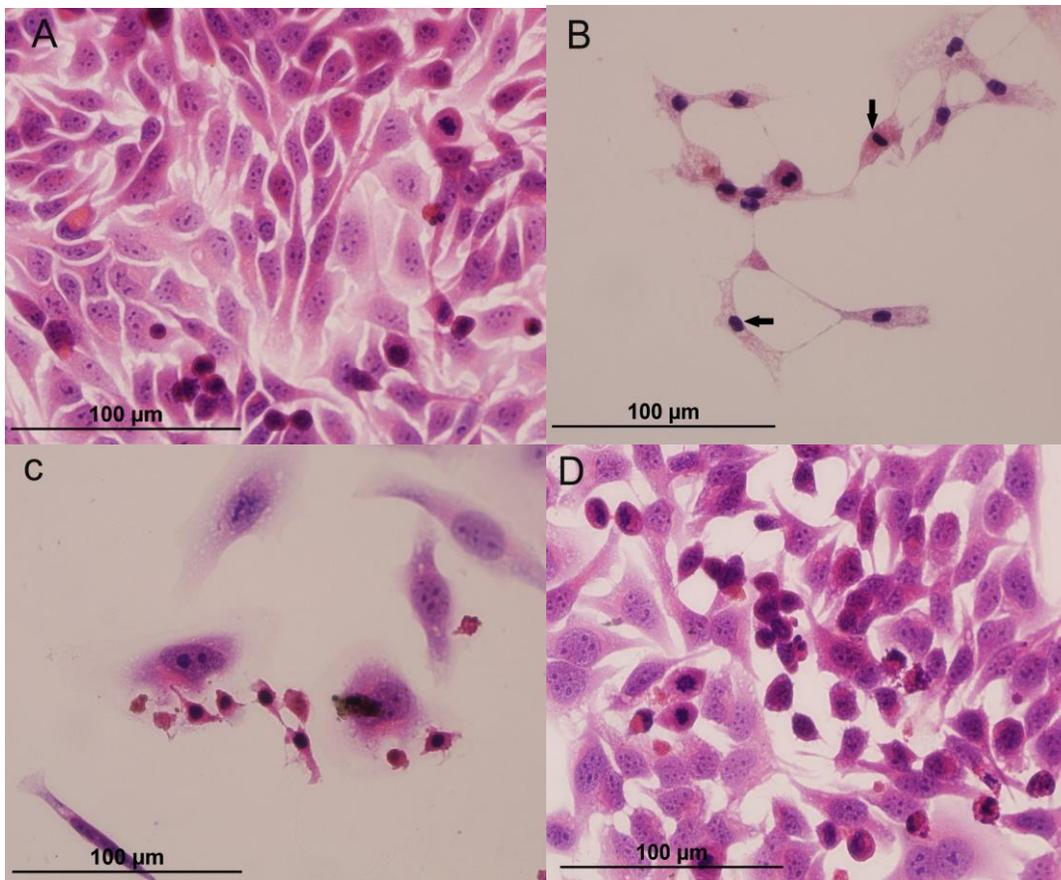


FIGURA 20 - EFEITOS DO TRATAMENTO COM UX, AGb e AG SOBRE A MORFOLOGIA DE CÉLULAS HeLa

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A morfologia celular foi avaliada pela coloração com hematoxilina e eosina. (A) células controle, (B) células tratadas com UX 250 µg/ml, (C) células tratadas com 250 µg/ml AGb e (D) células tratadas com 250 µg/ml AG. Aumento de 400x.

Em células HeLa, já foi demonstrado que o tratamento com xiloglucana de *Hymenaea courbaril*, na concentração de 200 µg/ml por 48 h, também provoca alterações na morfologia celular, provocando um condensamento celular e do núcleo (SILVEIRA, 2010). Já a arabinogalactana da goma de *Anadenanthera colubrina*, promoveu condensamento celular em células HeLa em doses de 25 a 100 µg/ml. Este polissacarídeo também promoveu a formação de *blebs* (MORETÃO *et al.*, 2004). O tratamento de células B16F10 com uma ramnogalacturonana do tipo I de *Abelmoschus esculentus* promoveu a formação de agregados celulares, diminuindo o espreado celular (VAYSSADE *et al.*, 2010).

4.2.5 Marcação com Anexina V-FITC/PI

A anexina tem sido empregada em ensaios de avaliação de morte celular. A anexina se liga de maneira eficiente a fosfatidilserina, um fosfolípídeo que se localiza na parte interna da membrana plásmica, mas que se externaliza rapidamente quando há um aumento no Ca^{++} intracelular ou no processo de apoptose. Esta externalização ocorre relativamente cedo no processo de apoptose celular e serve como reconhecimento de células apoptóticas por macrófagos. Dessa forma, a externalização da fosfatidilserina promove a remoção das células apoptóticas prevenindo a ruptura da membrana e liberação do conteúdo citoplasmático para o meio o que leva a um maior dano celular BRUMATTI *et al.*, 2008; LOGUE *et al.*, 2009).

Para verificar se os tratamentos induzem a morte celular por apoptose, células HeLa foram tratadas com UX nas concentrações de 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$ e com AGb e AG nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$, pelo tempo de 72 h. Após tratamento, as células foram processadas e avaliadas em citômetro de fluxo utilizando a dupla marcação com Anexina V-FITC/PI.

A figura 21 mostra os dot-plots representativos das células tratadas com UX, AGb e AG. Células viáveis estão mostradas no quadrante inferior direito do dot-plot, células necróticas aparecem no quadrante superior esquerdo, células nos estágios iniciais de apoptose estão marcadas no quadrante inferior direito (células que apresentam as membranas celulares intactas e apresentam somente marcação com anexina V-FITC) e células em apoptose tardia no quadrante superior direito.

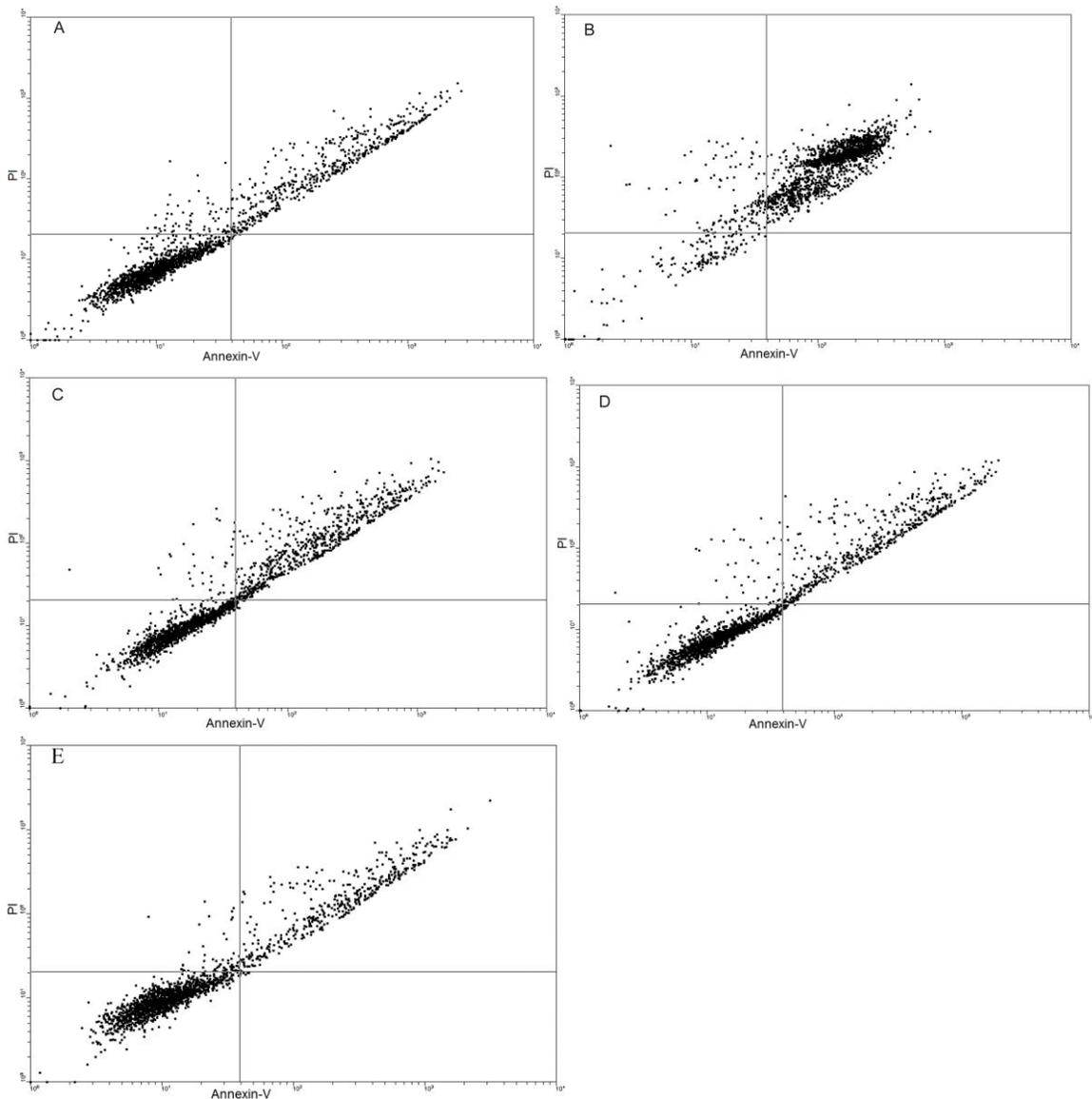


FIGURA 21 - DOT-PLOTS REPRESENTATIVOS DA AVALIAÇÃO DE MORTE CELULAR

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Dot-plots representativos da dupla marcação com anexina V-FITC/PI. (A) células controle, (B) controle positivo: células tratadas com H_2O_2 , (C) células tratadas com UX 250 $\mu g/ml$, (D) células tratadas com AGb 100 $\mu g/ml$, (E) células tratadas com AG 100 $\mu g/ml$. Tempo de tratamento: 72 h. O eixo y representa a fluorescência emitida pelo PI e o eixo X a fluorescência emitida pela anexina V-FITC.

Pode-se observar (Figura 22) que o tratamento com UX 250 $\mu g/ml$ aumentou a porcentagem de células marcadas com anexina-V (células apoptóticas) de 15% (grupo controle) para 32%. Concomitantemente houve uma diminuição na porcentagem de células viáveis de 75% (grupo controle) para 65%.

Os outros tratamentos não foram capazes de induzir morte celular, tanto por necrose, quanto por apoptose, nas condições experimentais utilizadas.

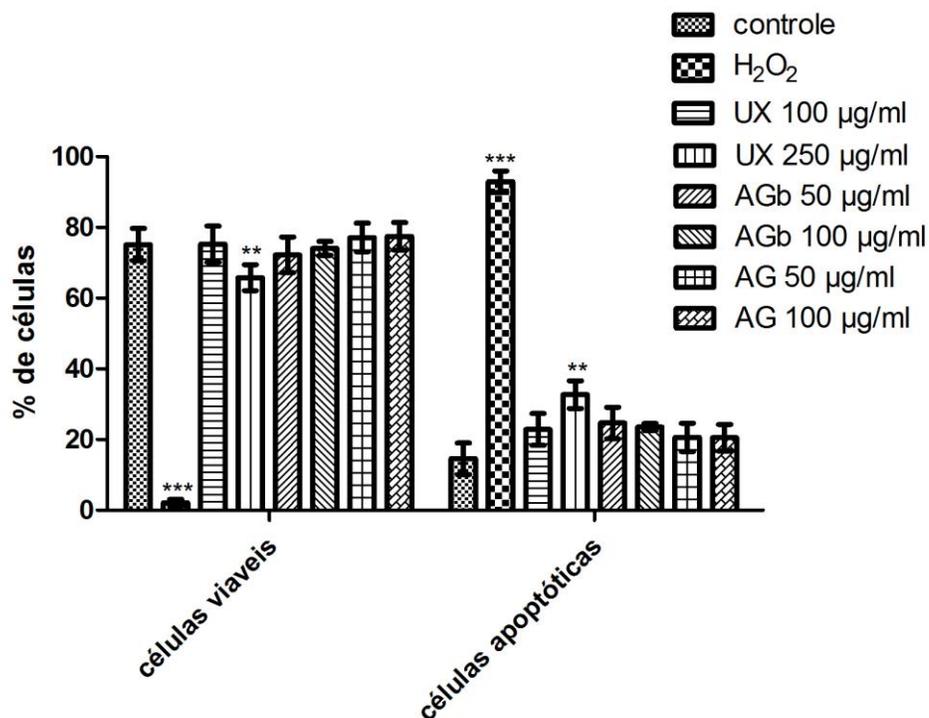


FIGURA 22 - PORCENTAGEM DE CÉLULAS HeLa VIAVÉIS E APOPTÓTICAS APÓS TRATAMENTO COM UX, AGb e AG .

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Porcentagens de células viáveis e apoptóticas analisadas após o tratamento de UX nas concentrações de 100 e 250 µg/ml e AGb e AG nas concentrações de 50 e 100 µg/ml por 72 h. O grupo controle representa as células tratadas apenas com o meio de cultura. Como controle positivo para apoptose foi utilizado o tratamento com H₂O₂ por 2 h. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em duplicata. ** p < 0.01, *** p < 0.001.

Já foi demonstrado que alguns polissacarídeos podem promover apoptose em células de câncer. CAO *et al.* (2010) mostraram que a arabinoglucana de *Angelica sinensis* aumentou a porcentagem de células HeLa marcadas com anexina-V de 1% (controle) para 9% quando tratadas com o polímero na concentração de 300 µg/ml. O polissacarídeo também é capaz de promover a liberação de citocromo c de maneira dose-dependente conforme analisado por western blotting. Os autores verificaram também a clivagem de caspase-9, mostrando que a arabinoglucana é capaz de promover apoptose em células HeLa

através da via intrínseca. Li *et al.* (2010), demonstraram que polissacarídeo isolado de *Mallus domestica*, composto principalmente de GalA, Glc e Gal foi capaz de induzir apoptose pela via dependente de caspases em linhagens de câncer coloretal (SW-1116, HT-29 e CACO-2).

4.2.6 Liberação de citocromo c

Para verificar se a morte celular provocada nas células HeLa é através da via intrínseca (mitocondrial) foi avaliada a liberação do citocromo c pelas células quando tratadas com UX, AGb e AG (Figura 23).

Para avaliar a liberação de citocromo c, as células HeLa foram tratadas com UX nas concentrações de 100 e 250 µg/ml e AGb e AG nas concentrações de 50 e 100 µg/ml pelo tempo de 72 h. Os resultados obtidos indicam que o tratamento com UX 250 µg/ml promoveu um aumento na liberação de citocromo c em 171% quando comparado ao controle, indicando que a morte celular promovida por UX envolve a liberação de citocromo c (apoptose pela via intrínseca). Para o tratamento com AGb e AG não foi observado liberação de citocromo c após o tratamento em relação ao controle. Este resultado já era esperado já que os tratamentos com AGb e AG não induziram apoptose, conforme mostrado anteriormente. Considerando os resultados obtidos, há indícios que o decocto das cascas de *Endopleura uchi* é capaz de promover apoptose de células HeLa através da via intrínseca e os polissacarídeos isolados do decocto reduzem a viabilidade de células HeLa, mas não influenciam o ciclo celular nem promovem apoptose.

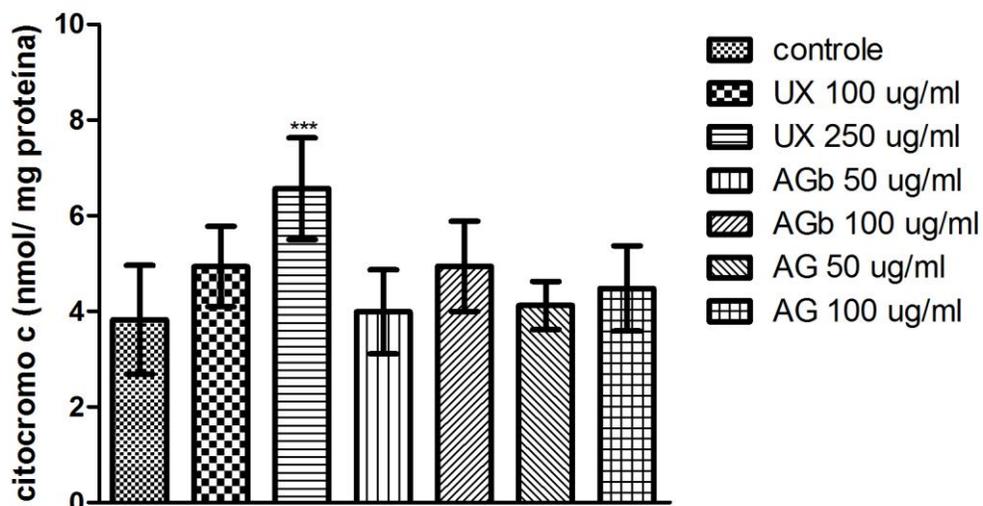


FIGURA 23 - EFEITO DE UX, AGb e AG SOBRE A LIBERAÇÃO DE CITOCROMO C EM CÉLULAS HeLa.

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A liberação de citocromo c foi avaliada espectrofotometricamente a 414 nm, após 72 h de tratamento. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrao de três experimentos independentes realizados em duplicatas. *** $p < 0,001$.

4.3 EFEITO DO DECOCTO E DOS POLISSACARÍDEOS DE *E. uchi* SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Sabe-se que os efeitos antiproliferativos exibidos por certos polissacarídeos sobre células tumorais podem ser devido a uma ação direta destes polímeros sobre as células cancerosas ou através de citotoxicidade mediada por ativação de macrófagos (KLIMP *et al.*, 2002). A ativação de macrófagos pode ser evidenciada através de alterações características em sua morfologia e/ou através de produtos secretados como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, citocinas entre outros. Tendo em vista os efeitos antiproliferativos diretos do decocto das cascas de *E. uchi* sobre células HeLa e, a ausência desta atividade pelos polissacarídeos isolados, o decocto e os polissacarídeos foram avaliados quanto a ativação de macrófagos para atividade antitumoral. As metodologias utilizadas foram a análise morfológica e produção de

anion superóxido e óxido nítrico. Estes parâmetros de ativação foram escolhidos por saber previamente que estão envolvidos na atividade antitumoral exercida por macrófagos.

4.3.1 Efeitos na viabilidade e morfologia celular

Primeiramente, se faz necessário avaliar a viabilidade celular de macrófagos tratados com as amostras UX, AGb e AG em diferentes concentrações, para determinar doses não tóxicas a serem utilizadas nos experimentos posteriores.

A viabilidade celular foi determinada no tempo de 48 h e as concentrações utilizadas das amostras variou de 10 a 500 µg/ml. Pode-se observar na Figura 24 que em todas as concentrações testadas, as amostras não exibiram citotoxicidade em macrófagos quando incubados por 48 h, exceto a fração AG na dose de 500 µg/ml que diminui a viabilidade em torno de 50%. Dessa maneira, as concentrações escolhidas para os testes seguintes foram as de 25, 50 e 100 µg/ml.

Diversos polissacarídeos já foram analisados quanto a sua citotoxicidade em macrófagos peritoneais. A arabinogalactana isolada da goma de *Anadenanthera coulubrina* não mostrou ser tóxica em concentrações até 300 µg/ml em até 5 h de incubação para macrófagos (MORETÃO *et al.*, 2003, 2004). A arabinogalactana isolada da planta *Phyllanthus niruri* comprometeu a viabilidade de macrófagos peritoneais de camundongos em aproximadamente 20% em concentrações superiores a 25 µg/ml (MELLINGER *et al.*, 2005). AMORIM (2012) mostraram que uma pectina de *Theobroma cacao* não apresentou citotoxicidade em concentrações entre 25 e 400 µg/ml. Esta mesma pectina, quando desacetilada, diminuiu a viabilidade em 20% somente na concentração de 400 µg/ml.

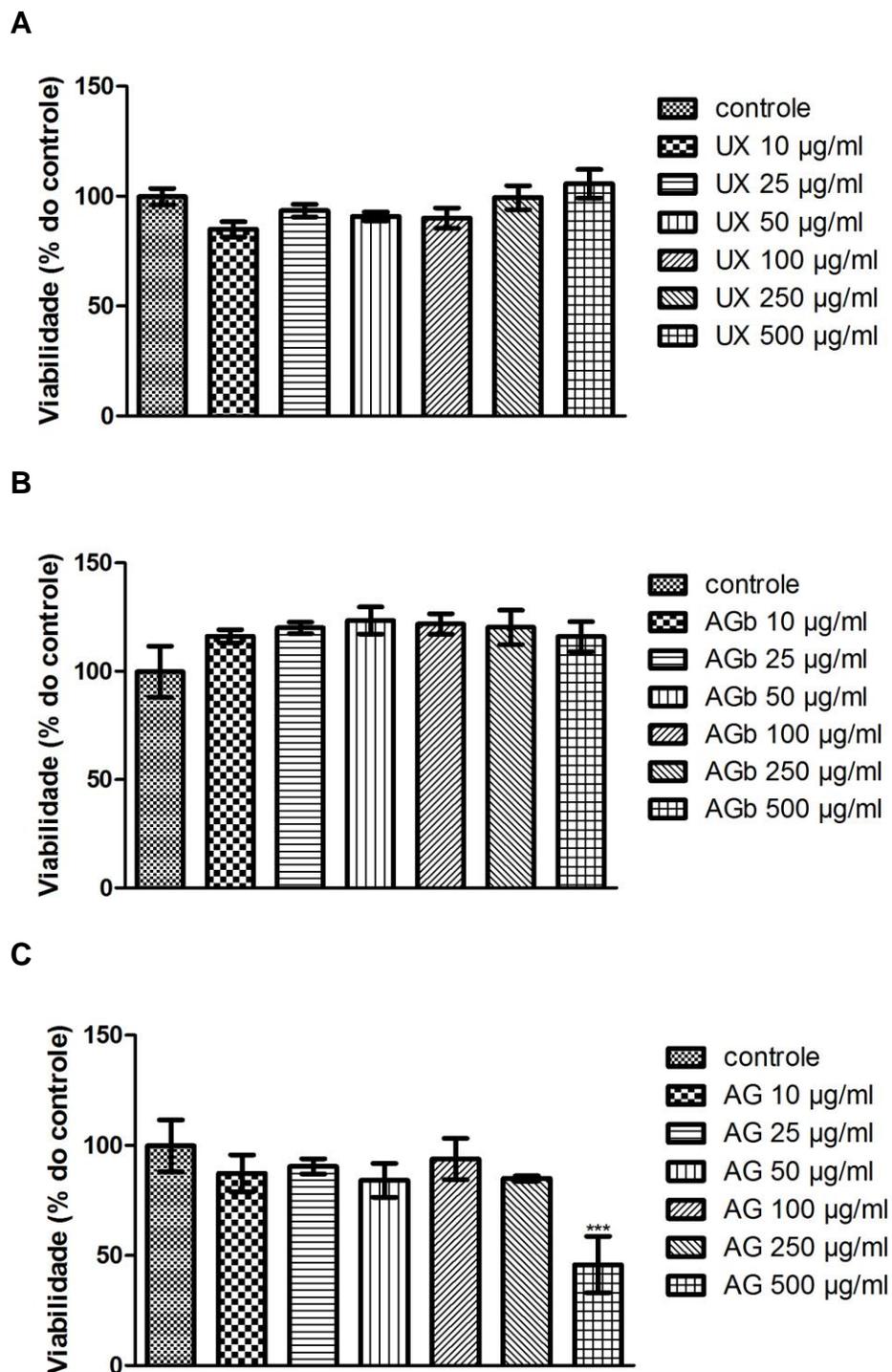


FIGURA 24 - VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM UX, AGb e AG POR 48 H

FONTE: o autor (2013)

Nota: Viabilidade celular de macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento com (A) UX, (B) AGb e (C) AG nas concentrações de 10, 25, 50, 100, 250 e 500 µg/ml. Viabilidade celular determinada pelo método do MTT. O grupo controle representa o grupo tratado somente com meio de cultura. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 5 experimentos, sendo cada experimento em triplicata. *** $p < 0,001$

ROSÁRIO *et al.* (2008) avaliaram os efeitos de xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM) em macrófagos peritoneais de camundongos. Neste estudo os autores, verificaram que os três polímeros nas concentrações de 10 µg/ml a 500 µg/ml não afetaram a viabilidade celular de macrófagos peritoneais em 2 h de tratamento. Já para o período de 48 h, apenas XGC e XGJ diminuíram a viabilidade.

A modulação de macrófagos pode também ser estudada através de análises morfológicas. De acordo com a literatura, macrófagos residentes, que não sofreram estímulo, possuem núcleo pequeno, poucas projeções citoplasmáticas e pouco espalhados. Já macrófagos ativados possuem citoplasma aumentado, núcleo grande e deslocado para periferia celular, várias projeções citoplasmáticas e grande capacidade de espalhamento e a presença de vacuolizações citoplasmáticas (BURGALETA *et al.*, 1978).

Pode-se observar que no tratamento controle (Figura 25A), observam-se características de macrófagos residentes (não estimulados): poucas projeções citoplasmáticas e presença de poucos vacúolos. O tratamento com UX (100 µg/ml) (Figura 25B) resulta em forte aumento de vacúolos no citoplasma e um grande aumento nas projeções citoplasmáticas. Os tratamentos com AGb e AG (Figuras 25C e 25D) promoveram aumento nas projeções citoplasmáticas e no tamanho do núcleo. Percebe-se também um aumento de vacúolos no citoplasma, entretanto de maneira mais discreta que o tratamento UX.

Em estudos utilizando análise morfológica realizados por Moretão *et al.* (2003), os autores verificaram que a arabinogalactana de *Anadenanthera coulubrina* foi capaz de ativar macrófagos isolados da cavidade peritoneal de camundongos tanto *in vitro* quanto *in vivo*). A porcentagem de macrófagos ativados foi de 40% em células não tratadas e de 90% com o tratamento *in vitro* por 48 h a 300 µg/ml. Macrófagos de animais tratados com 500 mg/kg de polímero por 24 h exibiram 70% de ativação. AMORIM (2012) verificou que a pectina de *Theobroma cacao* não modificou a característica de macrófagos residentes quando comparado ao controle. Entretanto, esta mesma pectina, quando

desacetilada, aumentou a proporção de macrófagos com características de macrófagos ativados em relação ao controle.

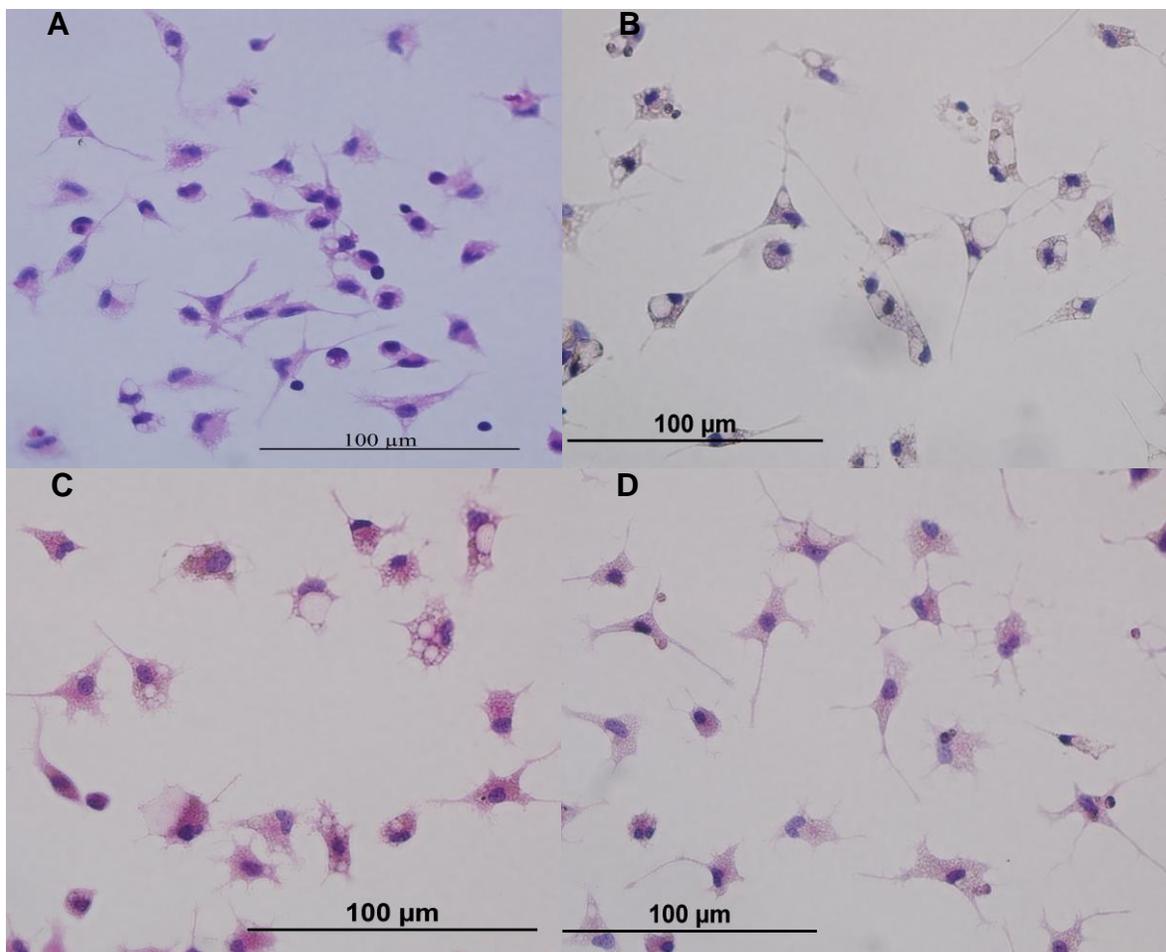


FIGURA 25 - EFEITOS DO TRATAMENTO COM UX, AGb e AG SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

FONTE: O autor (2013)

NOTA: A morfologia celular foi avaliada pela coloração com hematoxilina e eosina. (A) células controle, (B) células tratadas com UX 100 µg/ml, (C) células tratadas com AGb 100 µg/ml e (D) células tratadas com AG 100 µg/ml. Aumento de 400x.

4.3.2 Produção de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A imunidade inata representa a primeira barreira contra organismos invasores e os macrófagos possuem papel chave nesta imunidade. Eles são

capazes de internalizar e destruir organismos invasores. A ligação do patógeno aos receptores de membrana dos macrófagos levam a captura destes em vesículas intracelulares (fagossomo) e na síntese de uma variedade de substâncias tóxicas para matar este microorganismo internalizado, como a produção e liberação de ROS, num processo conhecido como *burst* respiratório (GROVES et al., 2008; RUSSEL et al., 2009).

Neste trabalho foi avaliada a interferência das frações UX, AGb e AG na produção de $O_2^{\bullet-}$. Foram utilizadas duas condições experimentais: células incubadas com os tratamentos na ausência e na presença de PMA, sendo este, um agente conhecido por seu efeito estimulador desta via (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006). A produção de $O_2^{\bullet-}$ foi avaliada através da redução extracelular do citocromo c (SASADA et al., 1983).

A Figura 26A mostra o efeito das frações UX, AGb e AG sobre a produção de $O_2^{\bullet-}$ na ausência de PMA. O resultado obtido para o decocto das cascas de *E. uchi* (UX) mostrou um estímulo dose-dependente na produção de $O_2^{\bullet-}$ nas concentrações testadas. UX 25, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ estimularam a produção de $O_2^{\bullet-}$ em 32, 48 e 96% quando comparados a controle. AGb estimulou a produção de $O_2^{\bullet-}$ em 30% somente na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. AG estimulou a produção de $O_2^{\bullet-}$ na concentração em 25 e 35% nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$.

A produção de ânion superóxido por macrófagos murinos tratados com decocto de *Uncaria perrottettii* foi avaliada por NUDO e CATAP (2011). Os autores observaram que, em macrófagos tratados com decocto de *U. perrottettii* na dose de 50 $\mu\text{g/ml}$ o aumento na produção de ânions superóxido foi semelhante ao estímulo produzido por PMA na dose de 1 $\mu\text{g/ml}$. Além disso, o decocto estimulou a capacidade fagocítica de macrófagos.

O efeito de arabinogalactanas isoladas de outras espécies vegetais sobre o *burst* respiratório já avaliado por diversos autores. Por exemplo, a arabinogalactana isolada das folhas de *Phyllanthus niruri* foi capaz de induzir a produção de $O_2^{\bullet-}$, sendo este efeito três vezes superior ao controle quando na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$ (MELLINGER et al., 2005). A mesma arabinogalactana, a 250 $\mu\text{g/ml}$, após tratamento com HCl que fragmentou a

molécula, apresentou um estímulo menor na produção de $O_2^{\bullet-}$ quando comparado a arabinogalactana nativa (duas vezes mais que o controle) (MELLINGER *et al.*, 2008).

Quatro arabinogalactanas, constituída majoritariamente por galactose, xilose, ramnose e ácido galacturônico, obtidas de *Juniperus scopolorum* foram capazes de estimular a produção de ROS de maneira dose-dependente nas concentrações de 25 a 400 $\mu\text{g/ml}$ em macrófagos peritoneais (SCHEPETKINS *et al.*, 2005). Os autores observaram uma relação entre a massa molar média do polisacarídeo e a intensidade do estímulo. Na concentração de 200 $\mu\text{g/ml}$, o polissacarídeo que apresentava maior massa molar (733 kDa) estimulou oito vezes mais a produção de ROS quando comparado com o grupo controle, enquanto que a arabinogalactana de 168 kDa aumentou a produção quatro vezes a mais que o controle, indicando que quanto maior a massa molar do polímero maior o efeito na produção de ROS.

A Figura 26B mostra o efeito produzido nos macrófagos peritoneais quando tratados com UX, AGb e AG nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ na presença de PMA. Para o decocto das cascas de *E. uchi* (UX) apresentaram um estímulo dose-dependente na produção de $O_2^{\bullet-}$. UX 25, 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$ estimularam a produção de $O_2^{\bullet-}$ em 50, 77 e 151% quando comparados a macrófagos estimulados com PMA na dose de 1 $\mu\text{g/ml}$. AGb estimulou a produção de ânions superóxido em 48% somente na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$ e AG produziu uma maior quantidade de $O_2^{\bullet-}$ na concentração de 50 e 100 $\mu\text{g/ml}$, estimulando essa via em 44 e 55% quando comparados ao controle. Estes dados indicam um efeito cumulativo destas frações com o PMA. Este efeito é diferente do observado para a glucana de *Ramalina celastri*, a qual estimulou a produção de H_2O_2 apenas na presença de PMA, não havendo estímulo na ausência de PMA. Este dado indica um efeito sinérgico da glucana com o PMA na indução do burst respiratório e não um efeito cumulativo (STUELP-CAMPELO *et al.*, 2002)

A



B



FIGURA 26 - PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM UX, AGb e AG POR 2 H

FONTE: o autor (2013)

Nota: Produção de ânions superóxidos por macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento com UX, AGb e AG nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/ml na (A) ausência e (B) presença de PMA. (1 µg/ml). Após o tempo de 2 h a absorbância do sobrenadante foi medida em 550 nm. A concentração de citocromo c reduzido, o qual corresponde à concentração de ânion superóxido produzido pelos macrófagos, foi determinada através do coeficiente de extinção molar ($C_{\text{oxid.red.}\Delta\epsilon} = 2,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$): $C = A/\epsilon$ (JOHNSTON *et al.*, 1978). O grupo controle representa o grupo tratado somente com meio de cultura. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão de 5 experimentos, sendo cada experimento em triplicata. *** $p < 0,001$

O efeito do extrato aquoso das sementes *Acacia cyanophylla* sobre a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$ por leucócitos ativados por zimozan, um estimulador do *burst*

respiratório, foi avaliado por ABBOUYI *et al.*, 2004. O extrato desta planta possui, *in vitro*, um significativo efeito estimulatório na produção de $O_2^{\bullet-}$ de maneira dose dependente, atingindo um efeito máximo na dose de 80 $\mu\text{g/ml}$. Da mesma maneira, leucócitos pré tratados com diclofenaco, uma droga antiinflamatória que diminui a produção de ânions superóxido, quando tratados com o extrato de *A. cyanopkylla* reverteram esse efeito após curta incubação (15 min), mostrando que este extrato é capaz de estimular esta via de maneira sinérgica ao zimozan.

A arabinogalactana de *Anadenanthera coulubrina* foi inoculada intraperitonealmente a 200 mg/kg e após 7 dias os macrófagos peritoneais foram coletados e incubados com citocromo c por 0 a 60 minutos. Para esta condição experimental, foi observada ativação da produção de $O_2^{\bullet-}$, chegando a cerca de 70% acima da produção dos macrófagos de camundongos não tratados após de 45 minutos de incubação. Quando esta incubação foi realizada na presença de PMA 1 $\mu\text{g/ml}$, foi observado efeito sinérgico do polímero, chegando a 48% de produção de $O_2^{\bullet-}$ acima do controle (animais não tratados) (MORETÃO *et al.*, 2003).

4.2.3 Produção de óxido nítrico

A produção de óxido nítrico por macrófagos é resultado da ativação de uma via de significativa importância para estas células exercerem sua função na resposta inflamatória. O NO^{\bullet} é capaz de inibir o crescimento de diversos agentes de doenças infecciosas como, por exemplo, bactérias, fungos, protozoários e parasitas helmínticos (BOGDAN, 2001; KORHONEN, 2005; ORTEGA *et al.*, 2008; COULTER *et al.*, 2008; LUNDBERG; WEITZBERG, 2009).

Além disso, NO^{\bullet} pode induzir apoptose em uma grande variedade de células, incluindo macrófagos, neurônios, hepatócitos, além de células tumorais. A apoptose induzida por NO^{\bullet} é normalmente acompanhada por acumulação do gene de supressão tumoral p53, mudanças na expressão de proteínas pró apoptóticas,

ativação de caspase-3 e translocação de citocromo c, indicando que a morte celular causada por NO• é normalmente mediado pela mitocôndria (LI; WOGAN, 2011). Entretanto em alguns tipos celulares, como neuroblastomas e células HL-60, ativação de caspase -8 e -2 foram observadas, indicando que a apoptose induzida por NO• pode se dar por vias que não envolvam a mitocôndria (MORYIA; UEHARA; NOMURA, 2000).

No presente trabalho, a produção de NO• foi avaliada utilizando macrófagos incubados por 48h. Esta via demanda mais tempo para se iniciar quando comparada com a produção de O₂•. Isso se deve a necessidade de expressar a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a qual não é expressa em grande quantidade em macrófagos não ativados (KORHONEN *et al.*, 2005). Nos experimentos foi utilizado LPS como controle positivo, pois ele é considerado o principal agente estimulador da produção de óxido nítrico, por promover a indução da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CUNHA *et al.*, 1993). As células foram tratadas com UX, AGb e AG nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/ml. Os resultados estão apresentados na Figura 27.

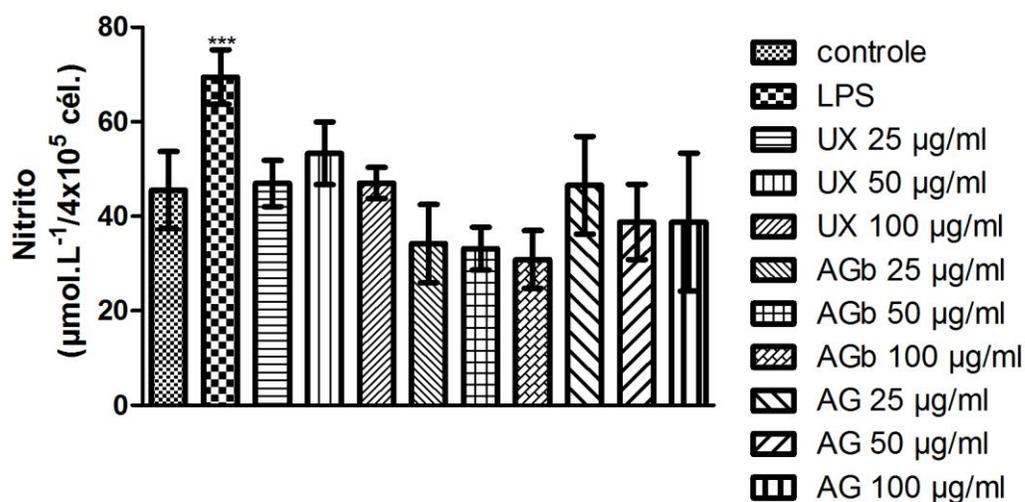


FIGURA 27 - PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM UX, AGb e AG POR 48 H
 FONTE: o autor (2013)

Nota: Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento com UX, AGb e AG nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/ml. Utilizou-se como controle positivo LPS (100 ng/ml). O NO• produzido foi quantificado no sobrenadante como nitrito pelo método de Griess. A absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 5 experimentos, sendo cada experimento em triplicata. *** p < 0,001

Pode-se observar que as frações UX, AGb e AG não foram capazes de estimular a produção de óxido nítrico em níveis superiores aos observados no grupo controle.

O efeito na produção de NO• por macrófagos quando incubados pelo extrato aquoso de *Nigella sativa* foi avaliado por MADJALAWIEH *et al.* (2010). Este extrato aquoso estimulou um produção NO• de maneira dose dependente por macrófagos na presença de IFN- γ , com um aumento 3 vezes maior na produção de óxido nítrico na dose de 100 $\mu\text{g/ml}$.

Já o extrato aquoso de *Clinopodium vulgare*, promoveu um diminuição na liberação de óxido nítrico por macrófagos RAW 264.7 tratados com LPS (1 $\mu\text{g/ml}$). Quando incubado com o LPS, o extrato na dose de 200 $\mu\text{g/ml}$ diminui a quantidade de óxido nítrico liberado em 10 vezes quando comparado aos macrófagos incubados somente com LPS, enquanto a dose de 300 $\mu\text{g/ml}$ diminui a níveis basais a produção de óxido nítrico, o que é uma evidência do efeito antiinflamatório atribuído a esta planta medicinal (BURK *et al.*, 2009).

Macrófagos tratados com várias concentrações do extrato aquoso de *Limoniastrum guyonianum* (25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g/ml}$) por 48 h apresentaram um aumento dose dependente da produção de NO•, que variou de 10,7 para 35,5% quando as concentrações aumentaram de 25 para 100 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (KRIFA *et al.*, 2013).

Com relação ao efeito de polissacarídeos na produção de NO•, o polissacarídeo ácido isolado da raiz da *Angelica sinensis*, composto de Man:Rha:GalA:Glc:Gal:Ara na relação molar de 0,44:1,00:10,52:7,52:8,19:14,43, significativamente estimulou a produção de NO• por macrófagos peritoneais. Este estímulo foi dose-dependente e nas concentrações de 30, 100, 300 e 500 $\mu\text{g/ml}$ houve um aumento na produção de NO• de 132, 157, 178, 289 e 275% (YANG *et al.*, 2007). Neste trabalho, quando macrófagos foram incubados com um inibidor da enzima iNOS, ocorreu a supressão do estímulo na produção de NO• pelo polissacarídeo, indicando que o polímero ativa a produção de NO• através da indução da expressão do gene da iNOS. Posteriormente, a análise de *western blot* confirmou este aumento na transcrição do gene iNOS (YANG *et al.*, 2007).

Três arabinogalactanas purificadas das raízes de *Baptista tinctoria* e *Echinaceae pallida* e da suspensão de células de *Echinaceae purpurea* exibiram diferenças em relação a sua atividade. A arabinogalactana isolada de *B. tinctoria* fortemente estimulou a produção de óxido nítrico enquanto a isolada de *E. purpurea* apresentou baixa atividade. Os autores sugerem que a presença de unidades de arabinose 5-ligadas é importante, já que a arabinogalactana de *B. tinctoria* contém 8,7% de arabinofuranose 5-ligadas enquanto a arabinogalactana de *E. purpurea* contém somente traços de unidades de arabinose neste tipo de ligação (CLASSEN *et al.*, 2006).

Entretanto há relatos de arabinogalactanas que não são capazes de estimular a produção de óxido nítrico. A arabinogalactana de *Anadenanthera colubrina* e *Phyllanthus niruri* não exibiram efeito sobre a produção de NO• de macrófagos isolados de camundongos tratados in vivo com este polímero (MORETÃO *et al.*, 2003; MELLINGER *et al.*, 2006).

Outros polissacrídeos são capazes de estimular a produção de NO•. As xiloglucanas isoladas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (XGC), *Hymenaea courbaril* (XGJ) e *Mucuna sloanei* (XGM), apresentaram diferenças de intensidade de efeito entre si sobre a produção de óxido nítrico em macrófagos peritoneais de camundongos. Foi observado um aumento de aproximadamente 262% a 307% para XGC e de aproximadamente 68% a 92% para XGJ para concentrações de 10 a 50 µg/ml em relação ao controle somente com meio. XGM não exerceu efeito sobre a produção de óxido nítrico (ROSÁRIO *et al.*, 2008).

A pectina de *Theobroma cacao* não estimulou a produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais em 48 h. Já a forma desacetilada desta pectina promove a ativação dessa via em níveis de significância comparado ao controle (AMORIM, 2012).

Levando em consideração a análise da morfologia dos macrófagos e a ativação do *burst* respiratório, há evidências que sugerem que os tratamentos UX, AGb e AG são capazes de ativar macrófagos sendo classificados como modificadores da resposta biológica (BRMs). Macrófagos ativados são capazes de reconhecer, se ligar e eliminar células tumorais e esta citotoxicidade medida por

macrófagos é um processo lento, dependente do contato célula a célula e necessita de 1 a 3 dias (KLIMP *et al.*, 2002). Esse efeito pode variar dependendo do tipo celular estudado. DAEMEN *et al.*, 1999 estudaram o efeito na lise de células de linhagem de mastocitomas P815, melanoma B16F10 e carcinoma B26 por macrófagos ativados. As células P815 foram as mais sensíveis à citotoxicidade mediada por macrófagos, atingindo uma lise de mais de 90% destas células. Outro fato interessante foi que células não tumorais não foram lisadas por macrófagos ativados, mas sofreram uma inibição na proliferação.

Os polissacarídeos isolados de *E. uchi* não apresentaram grande citotoxicidade contra células HeLa, entretanto foram capazes de ativar macrófagos peritoneais. A atividade anti-tumoral de polissacarídeos é geralmente atribuída à estimulação da resposta imune (OOI; LUI, 2000). Dessa forma, a hipótese de que os polissacarídeos podem promover uma citotoxicidade medida por macrófagos não pode ser descartada.

4.3 FRACIONAMENTO BIOGUIADO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Devido aos resultados obtidos neste trabalho que mostraram que o decocto das cascas do caule de *E. uchi* é citotóxico a células HeLa, decidiu-se por investigar os metabólitos secundários presentes nesta espécie. Além disso, poucos estudos envolvendo os metabólitos secundários presentes nesta espécie foram encontrados na literatura. Encontrou-se apenas o relato do isolamento de uma isocoumarina (MAGALHÃES *et al.*, 2007). Os resultados relacionados a esta investigação dos metabólitos secundários de *E. uchi* foram realizadas durante estágio sanduíche na Karlz-Franzens Universität localizada em Graz na Áustria sob supervisão do Prof. Dr. Rudolf Bauer.

Para obtenção dos metabólitos secundários, as cascas moídas de *Endopleura uchi* foram submetidas a extrações sequenciais com solventes de polaridade crescente, hexano, diclorometano, metanol e água, em aparelho

SOXHLET, originando 4 frações denominadas HEX, DCM, MeOH e H₂O, com rendimentos de 0,76%, 0,26%, 6,72% e 0,98%, respectivamente.

As frações obtidas foram analisadas por cromatografia em camada delgada para um *screening* inicial do conteúdo das amostras, utilizando as condições descritas no item 3.5.1.4. Além destas frações, o sobrenadante etanólico das precipitações do decocto das cascas de *Endopleura uchi* também foi utilizado na investigação dos metabólitos secundários. Esta fração recebeu a denominação de SUX e apresenta um rendimento em torno de 5,57 g%.

Duas fases móveis foram utilizadas: uma mais polar, constituída por acetato de etila:metanol:água (110:13,5:10); e outra mais apolar contendo tolueno:acetato de etila (95:5). Os reveladores utilizados estão descritos na Tabela 1 (página 50). Os cromatogramas estão apresentados nas Figuras 28, 29 e 30.

Pode-se observar que as frações obtidas apresentam diversas bandas mostrando a presença vários compostos. Todas as frações apresentaram bandas violáceas quando reveladas com vanilina e ácido sulfurico, além da presença de bandas intensas quando reveladas KOH 10% etanólico e com o reagente NA/PEG. Estes resultados indicam a presença de uma variedade grande de compostos, os quais podem pertencer as classes de flavonóides, coumarinas, antracenos, saponinas ou taninos. A revelação com os reagentes de Kedde e de Drogendorff mostrou que não houve reação da amostra com estes reativos, indicando a ausência de glicosídeos cardiotônicos e alcalóides, respectivamente.

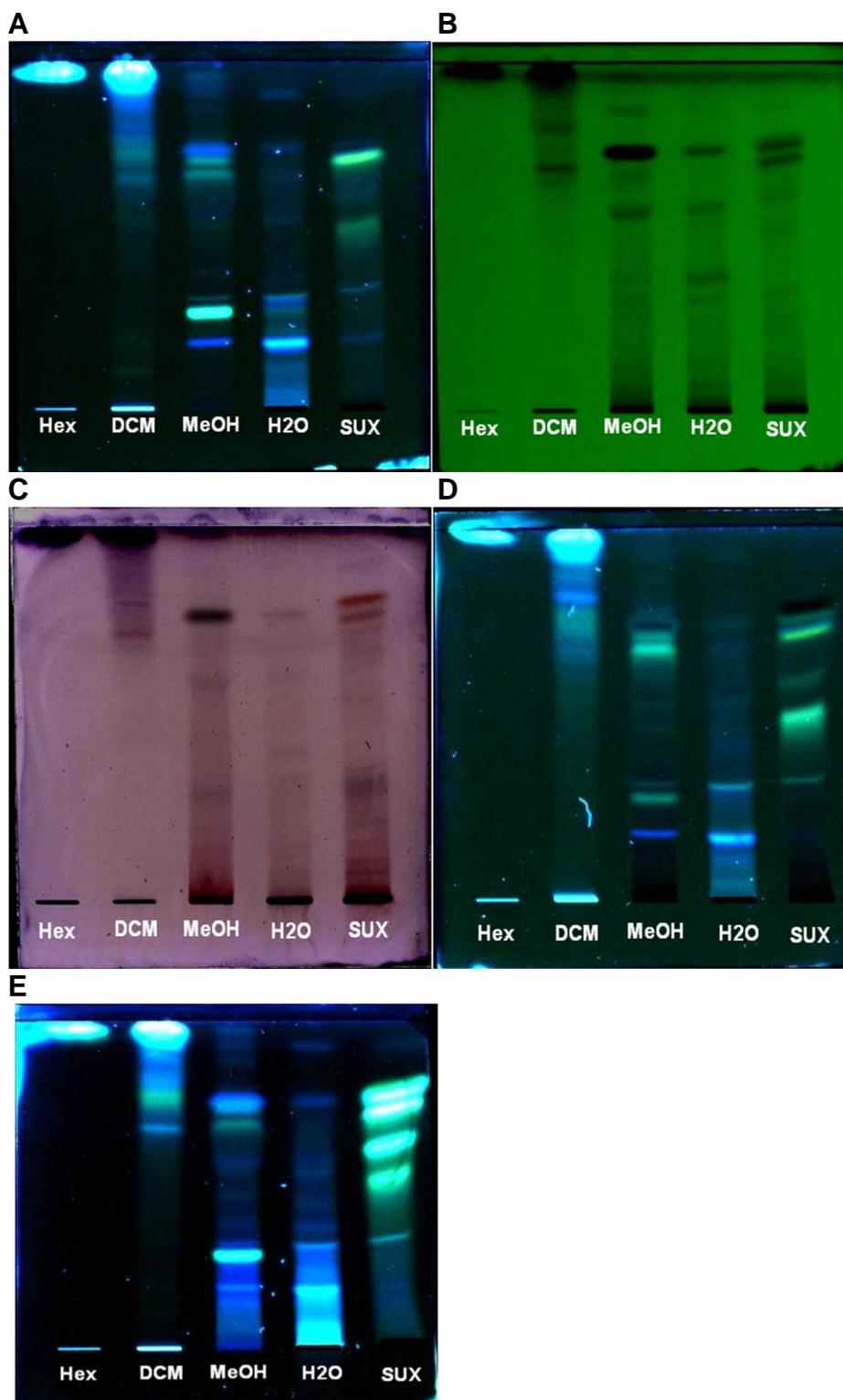


FIGURA 28 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES HEX, DMC, MeOH , H₂O E SUX

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando a fase móvel acetato de etila:metanol:água 110:13,5:10. Os reveladores utilizados foram (A) UV 366 nm, (B) UV 254 nm, (C) vanilina + ácido sulfúrico, (D) KOH 10% etanólico e (E) NA/PEG.

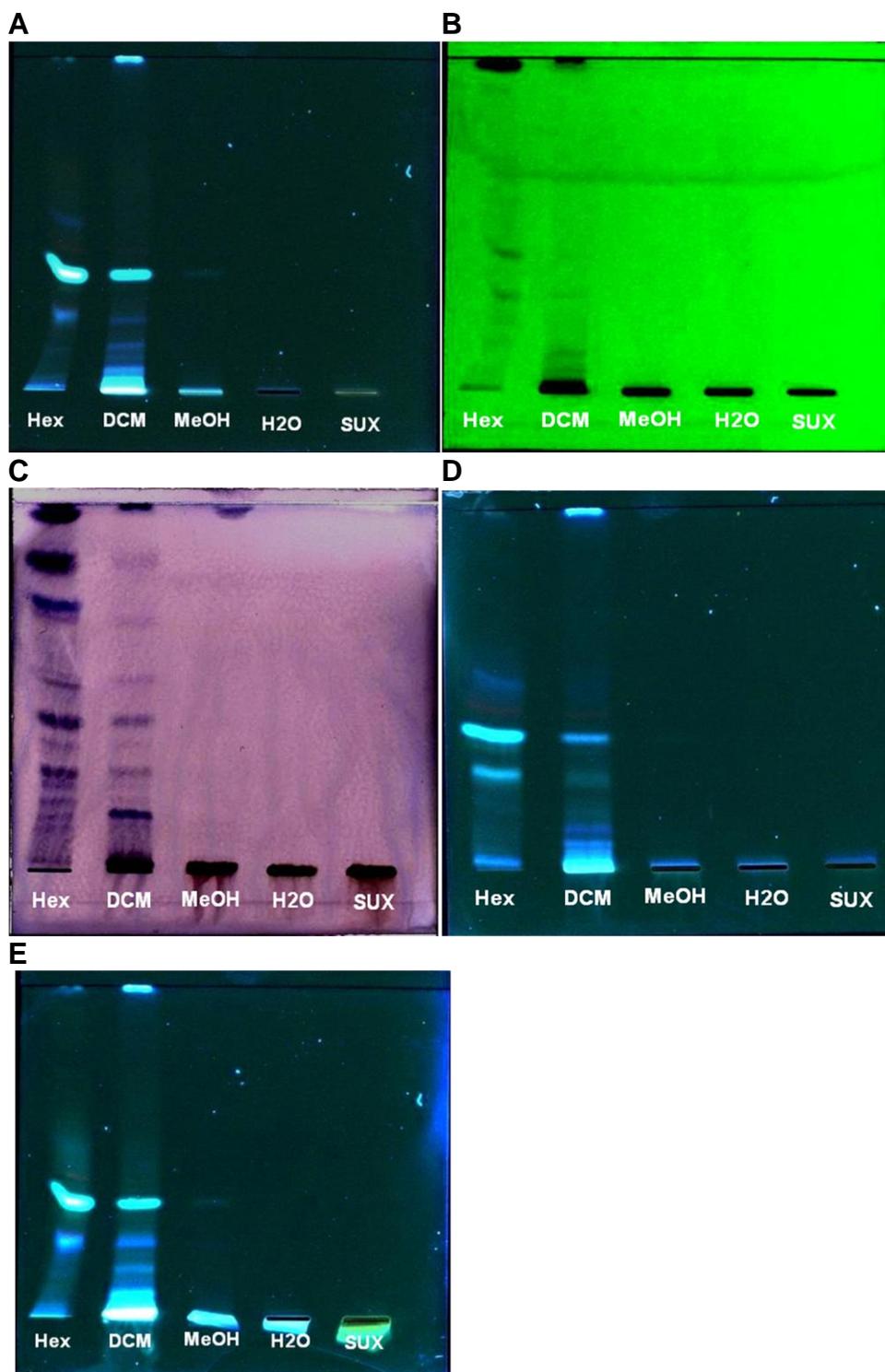


FIGURA 29 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES HEX, DMC, MeOH , H₂O E SUX

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando a fase móvel tolueno:acetato de etila 95:5. Os reveladores utilizados foram (A) UV 366 nm, (B) UV 254 nm, (C) vanilina + ácido sulfúrico, (D) KOH 10% etanólico e (E) NA/PEG.

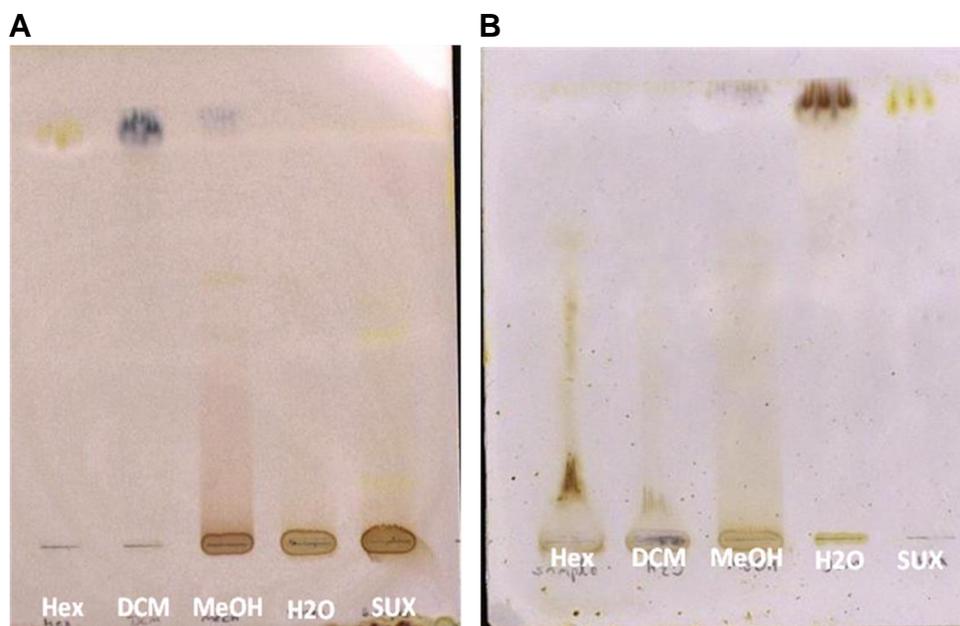


FIGURA 30 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES HEX, DCM, MeOH, H₂O E SUX

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando a fase móvel acetato de etila:metanol:água 100:13,5:10. Os reveladores utilizados foram (A) Reagente de Kedde e (B) Reagente de Drogendorff.

Em seguida foi realizado o teste de citotoxicidade das amostras HEX, DCM, MeOH, H₂O e SUX contra a linhagem celular CCRF-CEM (linfoblastos humanos obtidos do sangue periférico de uma criança com leucemia aguda) através do método XTT (Figura 31). Pode se observar que todas as frações apresentam citotoxicidade contra a linhagem CCRF-CEM. A fração HEX apresentou citotoxicidade apenas na concentração de 100 µg/ml inibindo o crescimento celular em 60%. A fração extraída com metanol inibiu o crescimento nas doses de 50 e 100 µg/ml em 50 e 63%. A fração H₂O e SUX apresentaram ações semelhantes, onde as concentrações de 50 e 100 µg/ml foram citotóxicas inibindo o crescimento das células CCRF-CEM em 70%, sendo que este efeito não foi dose dependente. Já a fração DCM foi a fração mais ativa inibindo o crescimento das células em 68 e 75% nas concentrações de 50 e 100 µg/ml. A fração DCM foi escolhida para as etapas seguintes de purificação por ser a fração mais ativa. A fração SUX também foi escolhida para as análises por ser proveniente do decocto e assim conter compostos que são ingeridos com o chá.

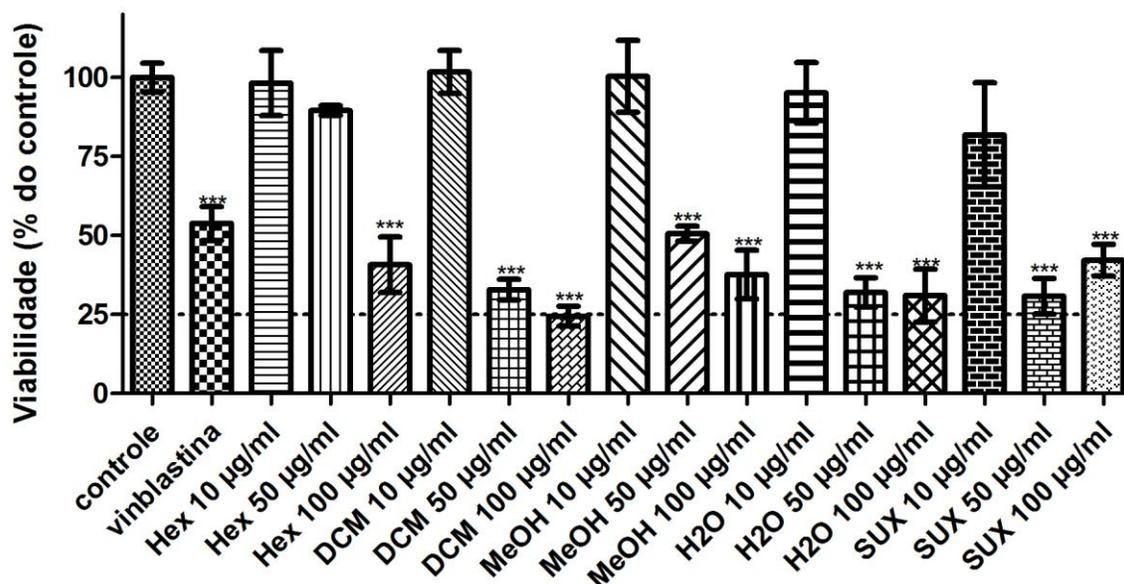


FIGURA 31 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CCRF-CEM TRATADO COM AS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DAS CASCAS DE *E. uchi*.

FONTES: O Autor (2013)

Nota: Resultados obtidos para viabilidade concentrações de 10, 50 e 100 µg/ml. Após 72 h na presença dos extratos a 37 °C sob 5% de CO₂, 20 µL de XTT foi adicionado ao meio. Após três h a absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). *** p < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura). Vinblastina foi usada como controle positivo

Os fracionamentos foram guiados conforme o fluxograma mostrado na Figura 32. Para o fracionamento da amostra extraída com diclorometano foi utilizado a técnica de fracionamento em fase sólida (*solid phase extraction* - SPE) sendo realizada utilizando seringas WHATMAN de 12 ml eluídas com diferentes concentrações de metanol seguido por acetonitrila, conforme descrito no item 3.16.2. Primeiramente, a amostra DCM foi solubilizada em metanol e adicionada ao cartucho já equilibrado da SPE contendo a matriz adsorvente. Após isso, a seringa foi eluída com concentrações crescente de metanol: 20, 40, 80 e 100%. As frações resultantes (SPE 20, 40, 80, e 100) foram coletadas, secas sob fluxo de nitrogênio e testes de viabilidade celular foram realizados contra células CCRF-CEM. Pode-se observar novamente que todas as frações obtidas pelo fracionamento por SPE com metanol (Figura 33) apresentaram citotoxicidade. A fração eluída com 100% de metanol foi a mais citotóxica, sendo capaz de diminuir a viabilidade em 41 e 64% nas concentrações de 10 e 50 µg/ml, respectivamente.

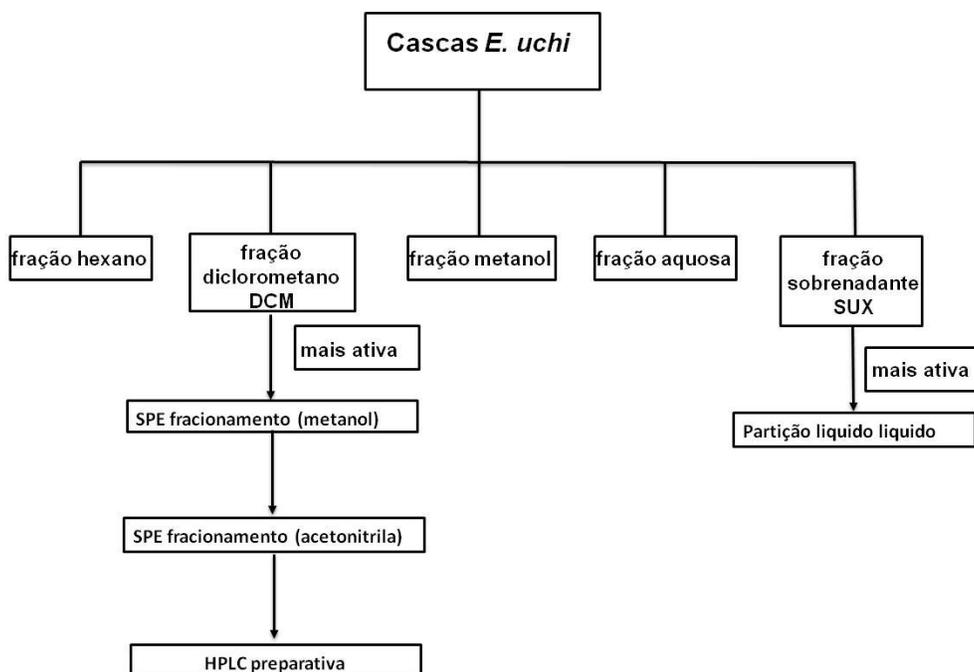


FIGURA 32 - FLUXOGRAMA DE FRACIONAMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS DAS CASCAS DE *E. uchi*.

FONTE: O Autor (2013)

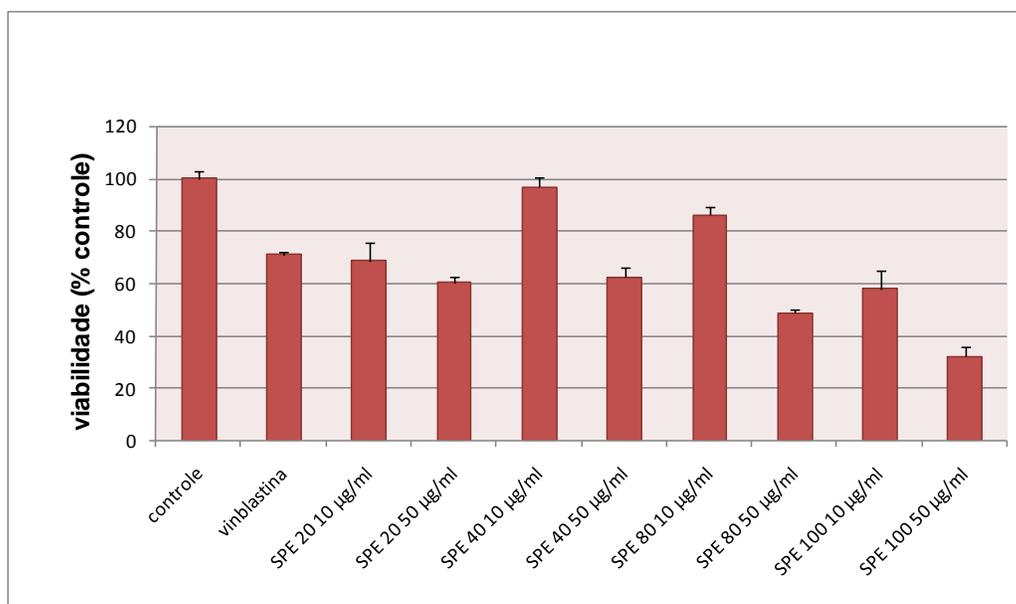


FIGURA 33 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CCRF-CEM TRATADO COM AS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO POR FASE SÓLIDA COM METANOL DA FRAÇÃO DCM

FONTE: O Autor (2013)

Nota: Resultados obtidos para viabilidade concentrações de 10 e 50 µg/ml. Após 72 h na presença dos extratos a 37 °C sob 5% de CO₂, 20 µL de XTT foi adicionado ao meio. Após três h a absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). *** p < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura). Vinblastina foi usada como controle positivo

A amostra obtida a partir do fracionamento com metanol 100% foi seca sob fluxo de nitrogênio e, em seguida, foi submetida a novo fracionamento por fase sólida (SPE) desta vez utilizando acetonitrila como solvente. Esta fração foi solubilizada em acetonitrila, adicionada a coluna de SPE já equilibrada e diferentes concentrações de acetonitrila foram utilizadas para eluição dos compostos: 10, 20, 40, 50, 60, 80, 90 e 100%. Após a eluição com acetonitrila, foram realizadas duas eluições com acetona e diclorometano, respectivamente. As amostras foram recolhidas e secas sob fluxo de nitrogênio. As frações obtidas e os rendimentos estão mostrados na Tabela 6.

TABELA 6 – FRAÇÕES OBTIDAS PELO FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA DA AMOSTRA OBTIDA PELA EXTRAÇÃO COM DICLOROMETANO DAS CASCAS DE *E. uchi*

Solvente	Fração	Rendimento (mg)
Acetonitrila 10%	SPE 10	3,87
Acetonitrila 20%	SPE 20	1,01
Acetonitrila 40%	SPE 40	7,7
Acetonitrila 50%	SPE 50	4,27
Acetonitrila 60%	SPE 60	5,02
Acetonitrila 80%	SPE 80	13,77
Acetonitrila 90%	SPE 90	11,9
Acetonitrila 100%	SPE 100	99,75
Acetona	SPE ace	71,49
Diclorometano	SPE dcm	29,3

As frações obtidas por este fracionamento foram analisadas por cromatografia de camada delgada (Figura 34). Os cromatogramas novamente mostram amostras complexas contendo diversos compostos. As frações obtidas por este fracionamento foram então submetidas a avaliação de citotoxicidade contra células CCRF-CEM (Figura 35). As frações eluídas com concentrações de acetonitrila entre 10 e 90% afetaram a viabilidade de células CCRF-CEM, enquanto as frações eluídas com acetonitrila 100%, acetona e diclorometano não apresentaram citotoxicidade. Das frações ativas, a que apresentou maior citotoxicidade foi a fração eluída com acetonitrila 90%, sendo que na concentração de 50 µg/ml a inibição foi de 90%.

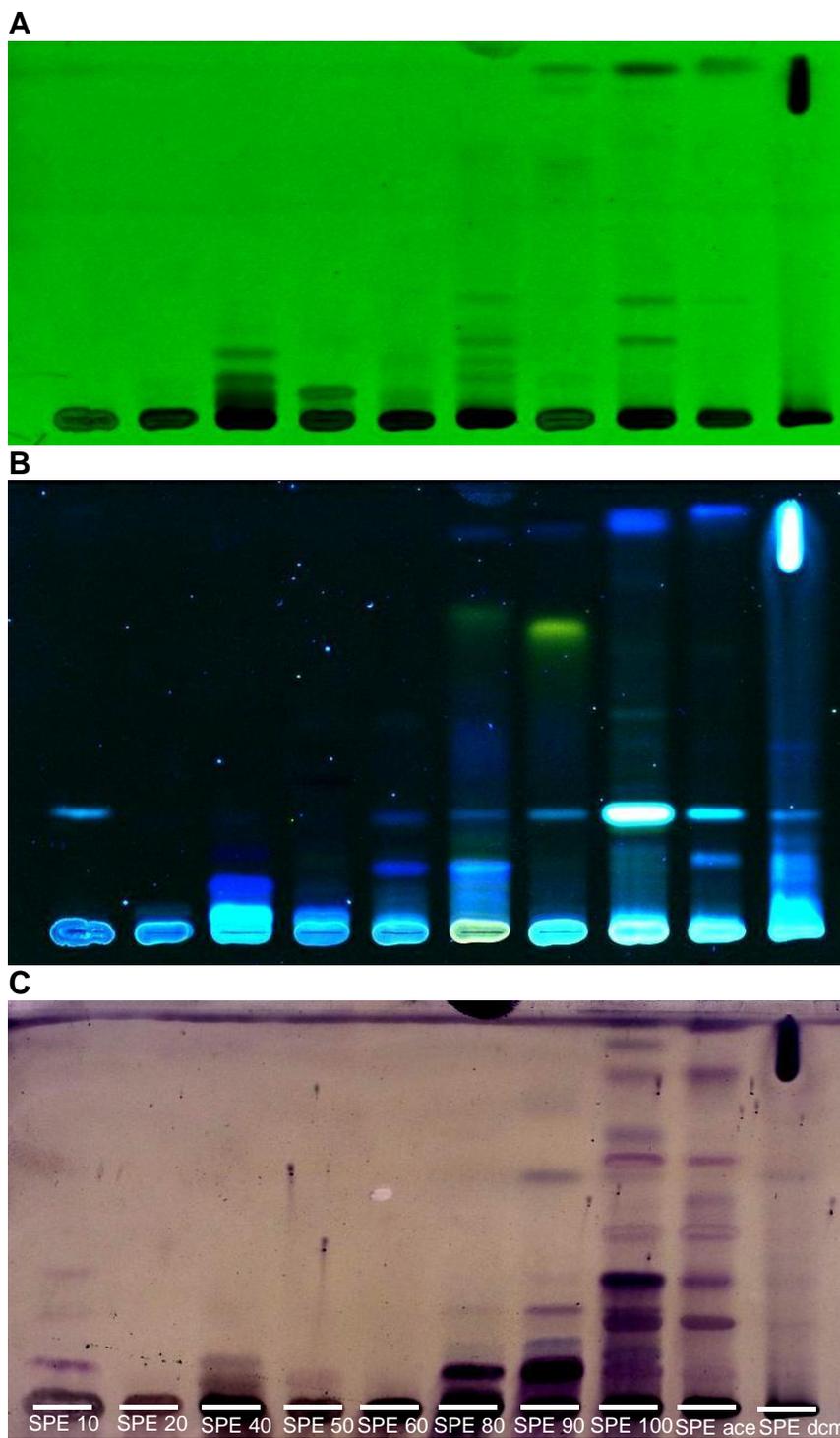


FIGURA 34 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELO FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA ELUÍDAS COM ACETONITRILA A PARTIR DA FRAÇÃO DCM

FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando a fase móvel tolueno: acetato de etila 95:5. Os reveladores utilizados foram (A) UV 254, (B) KOH 10% etanólico e (C) vanilina + ácido sulfúrico.

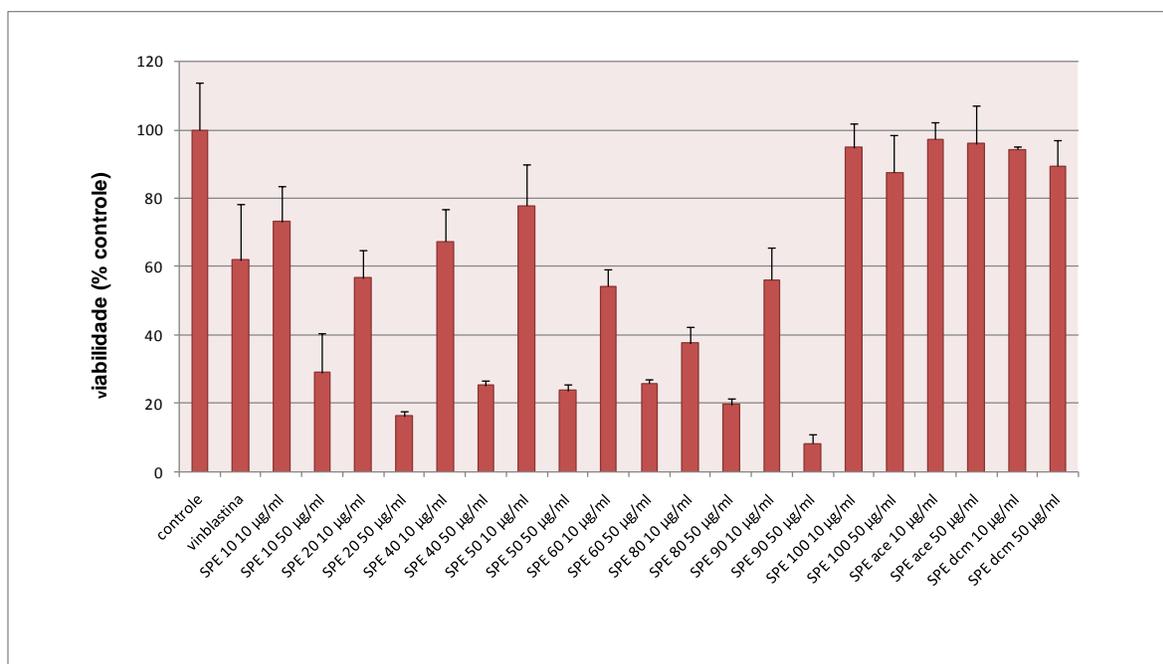


FIGURA 35 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CCRF-CEM TRATADO COM AS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO POR FASE SÓLIDA COM ACETONITRILA DA FRAÇÃO DCM
 FONTE: O Autor (2013)

Nota: Resultados obtidos para viabilidade concentrações de 10 e 50 µg/ml. Após 72 h na presença dos extratos a 37 °C sob 5% de CO₂, 20 µL de XTT foi adicionado ao meio. Após três h a absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). *** p < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura). Vinblastina foi usada como controle positivo

Esta fração (SPE 90) foi analisada por cromatografia líquida de alta pressão. O perfil de eluição está mostrado na Figura 36. O cromatograma mostra a presença de vários picos, indicando que mesmo após duas etapas de fracionamento, ainda existem diversos compostos na amostra.

A partir da análise do perfil de eluição da amostra, optou-se por, em seguida, submeter esta fração a um fracionamento por HPLC preparativa, uma técnica onde volume maior de frações são injetadas e as amostras são coletadas a medida que os picos são detectados no cromatograma. Este fracionamento originou 14 novas frações a partir da amostra SPE 90. Todas as 14 frações originadas do fracionamento por cromatografia preparativa foram analisadas por HPLC e 5 destas frações apresentaram possíveis perfis de amostras puras: JB-UXI-1a, JB-UXI-6b, JB-UXI-7b, JB-UXI-9 e JB-UXI-10, sendo que o rendimento

destas frações foi de 1,55; 1,25; 1,54; 0,86; 1,76 e 0,93 mg, respectivamente. O perfil de eluição por HPLC destas frações está mostrado na Figura 35.

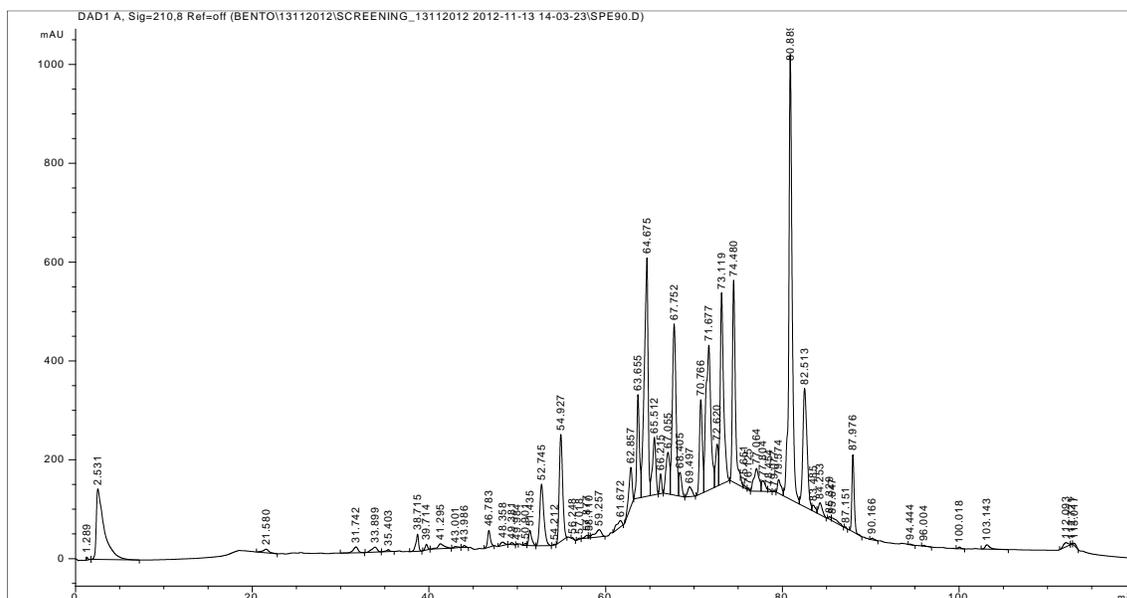


FIGURA 36 - PERFIL DE ELUIÇÃO DA AMOSTRA SPE 90

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: Perfil Cromatográfico da amostra SPE 90 eluídas com gradiente de acetonitrila/água por 120 min e detecção por UV 210 nm.

As frações foram analisadas por C^{13} -RMN e somente a fração JB-UXI-9 continha uma amostra pura e pode ser identificada. A análise do espectro da fração JB-UXI-9 indicou tratar-se de um ácido graxo. Não foi possível a realização de outros processos de fracionamento das amostras, pois após a cromatografia preparativa, a quantidade de material disponível era insuficiente (em torno de 1 mg).

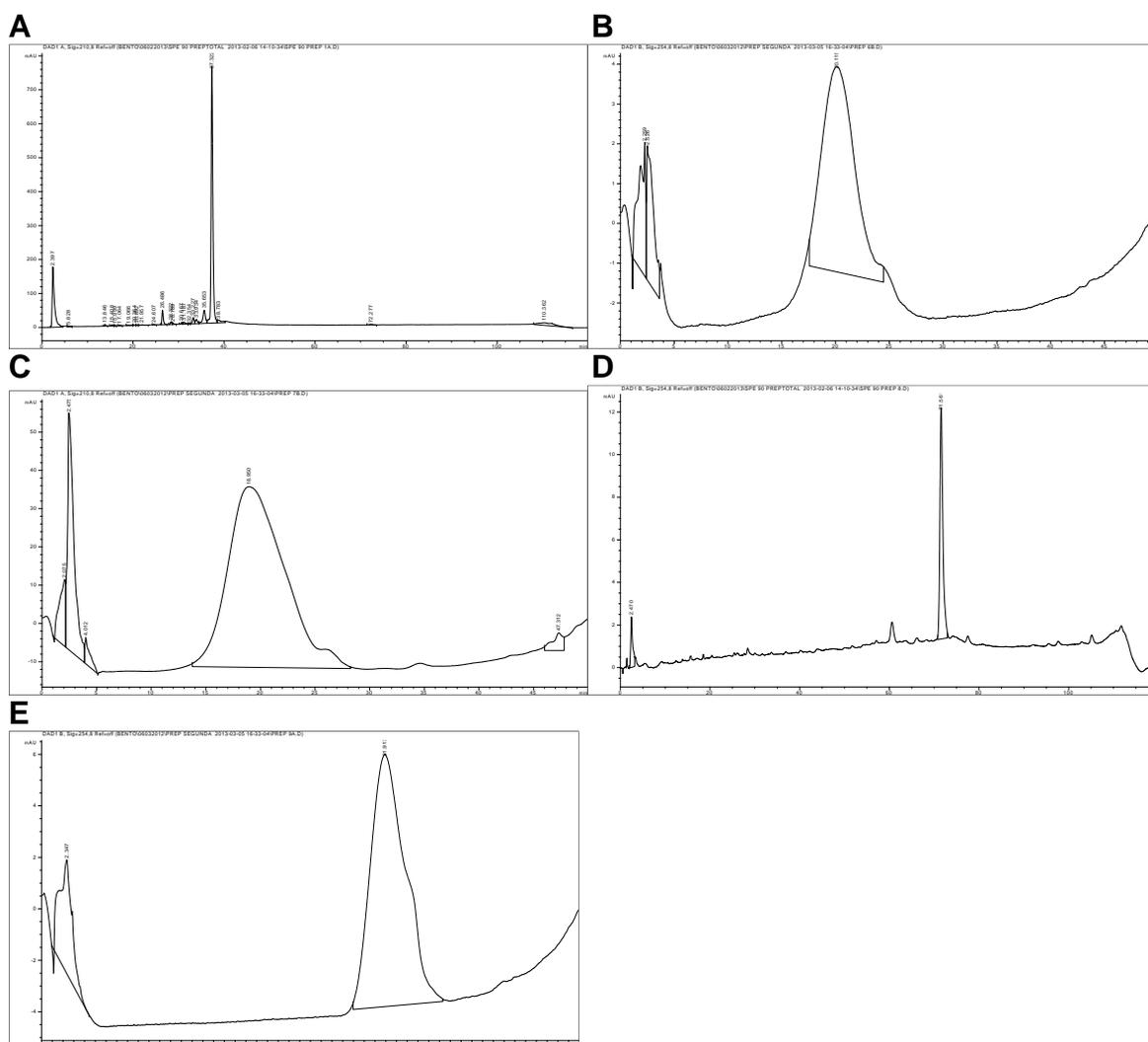


FIGURA 37 - PERFIL DE ELUIÇÃO DAS AMOSTRAS JB-UXI-1a, JB-UXI-6b, JB-UXI-7b, JB-UXI-9 E JB-UXI-10

FONTE: O Autor (2013)

NOTA: Perfil Cromatográfico das amostras (A) JB-UXI-1a, (B) JB-UXI-6b, (C) JB-UXI-7b, (D) JB-UXI-9 e (E) JB-UXI-10 SPEluidas com gradiente de acetonitrila/água e detecção por UV 210 nm.

A amostra SUX foi fracionada utilizando-se a técnica de separação em por sílica em gel, de acordo com o item 3.16.1. Para o fracionamento desta amostra sample foi utilizada a técnica de cromatografia em coluna, como preenchimento foi utilizado sílica gel 60 (mash 0,05-0,2). Cerca de 20 g da amostra SUX solubilizada em metanol: água (1:1) e adicionada à coluna e uma mistura crescente de clorofórmio:metanol (100:0 até 0:100) foi usada para eluição dos componentes,

conforme mostrado na Tabela 2. As frações obtidas foram secas sob fluxo de nitrogênio e analisadas por cromatografia em camada delgada (Figura 38).

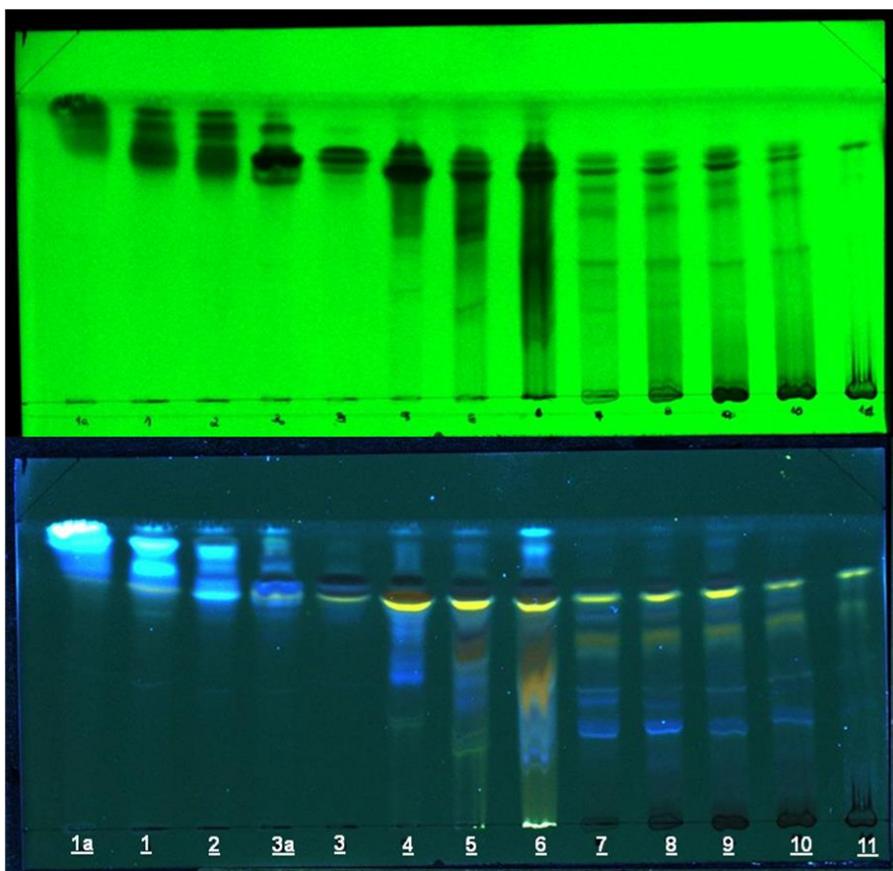


FIGURA 38 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DAS FRAÇÕES OBTIDAS PELO FRACIONAMENTO POR EXTRAÇÃO EM SILICA GEL A PARTIR DA FRAÇÃO SUX
FONTE: O autor (2013)

NOTA: Os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando a fase móvel acetato de etila:metanol:água 100:13,5:10. Os reveladores utilizados foram UV 254 e 366.

Em seguida foi realizado o teste de citotoxicidade destas amostras provenientes do fracionamento da amostra SUX contra a linhagem celular CCRF-CEM (Figura 39). Pode se observar que diversas frações apresentam citotoxicidade contra a linhagem CCRF-CEM, entretanto a fração 1a (eluída com metanol:clorofórmio na proporção de 5:95) diminui a viabilidade das células CCRF-CEM em aproximadamente 80% na concentração de 50 µg/ml, sendo a fração mais ativa.

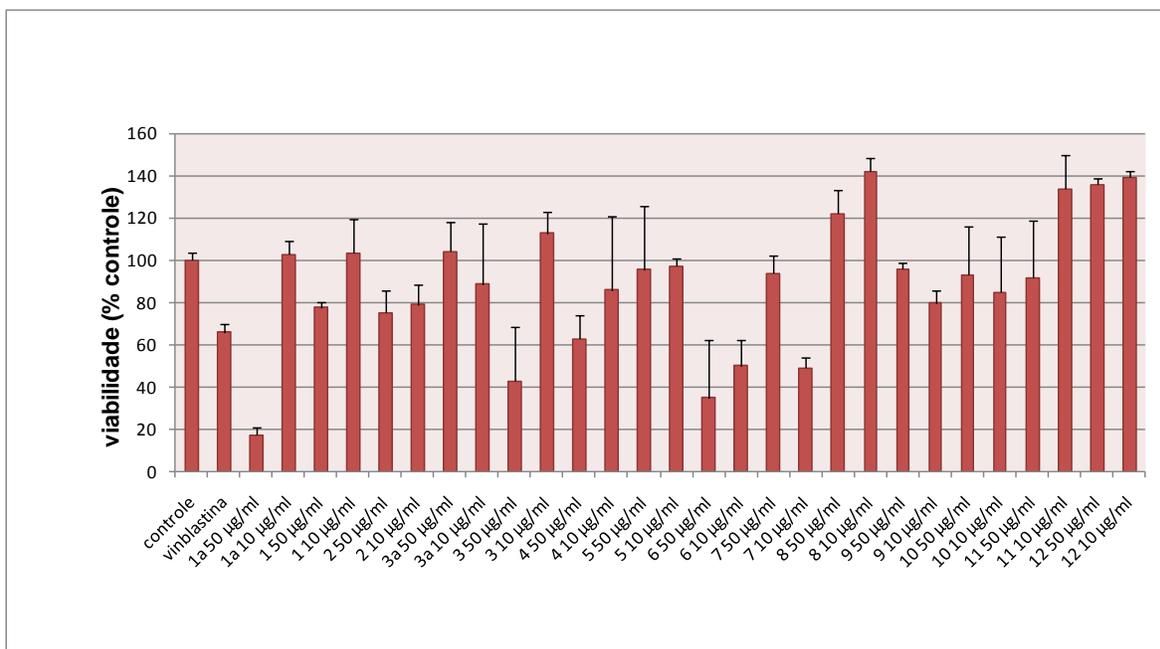


FIGURA 39 - VIABILIDADE CELULAR DAS CÉLULAS CCRF-CEM TRATADO COM AS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DO FRACIONAMENTO POR SILICA EM GEL COM DA FRAÇÃO SUX

FONTE: O Autor (2013)

Nota: Resultados obtidos para viabilidade concentrações de 10 e 50 µg/ml. Após 72 h na presença dos extratos a 37 °C sob 5% de CO₂, 20 µL de XTT foi adicionado ao meio. Após três h a absorbância foi medida em 550 nm. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n = 3, sendo cada experimento em triplicata). *** p < 0,001 em relação ao controle (células tratadas apenas com meio de cultura). Vinblastina foi usada como controle positivo

A fração 1a também foi testada em linhagens de adenocarcinoma uterino humano (células HeLa), modelo utilizado neste trabalho nos experimentos com o decocto das cascas de *E. uchi* e dos polissacarídeos isolados, conforme já descrito. A escolha de células HeLa se dá também, pois um dos usos tradicionais do chá de *Endopleura uchi* é contra miomas uterinos. A fração 1a diminui a viabilidade das células HeLa de maneira dose dependente. A redução foi de aproximadamente 20, 80 e 94% nas doses de 10, 50 e 100 µg/ml (Figura 40). Estes resultados indicam que a fração 1a pode ser a fração que contém o composto citotóxico ativo do decocto das cascas de *E. uchi*. Outras análises são necessárias para isolamento e caracterização deste composto.

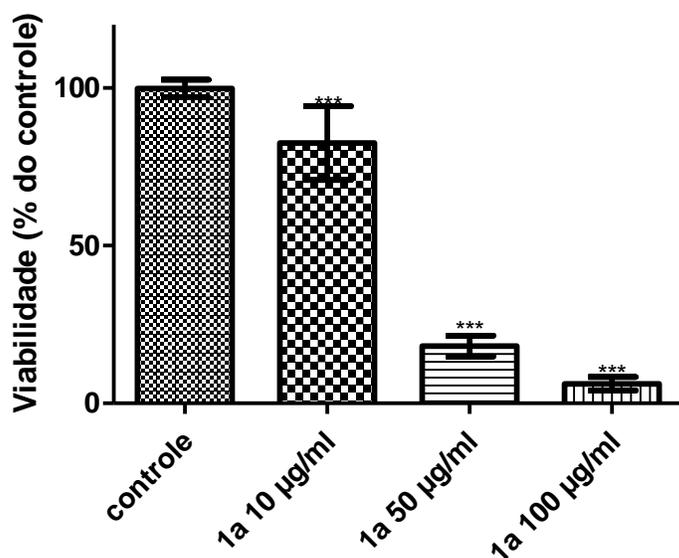


FIGURA 40 – EFEITO DA FRAÇÃO 1A OBTIDA DO FRACIONAMENTO DA AMOSTRA SUX SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS HeLa
 FONTE: O autor (2013).

NOTA: A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do cristal violeta após tratamento com UX nas concentrações de 10, 50 e 100 µg/ml. O grupo controle representa o grupo tratado apenas com o meio de cultura. Os resultados estão expressos como média ± desvio padrão de 3 experimentos independentes realizados em triplicata. *** $p < 0,001$ em relação ao controle

4.4 DISCUSSÃO FINAL

Plantas medicinais são uma alternativa comum na prevenção ou tratamento do câncer em muitos países (NAWAB *et al.*, 2011). O uso de plantas medicinais como forma de tratamento de diversas patologias é uma crescente mundial e, com este aumento do uso da fitoterapia, surgiu também a necessidade de se investigar os componentes químicos e os papéis biológicos que estes poderiam estar desempenhando no organismo do homem.

É estimado que apenas 25.000 espécies de plantas foram estudadas quanto ao seu potencial de aplicação na medicina. Esta é uma pequena fração quando comparadas às 250.000 espécies de plantas no mundo (NEWMAN; CRAGG, 2007).

O Brasil é proprietário da maior biodiversidade do planeta, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do mundo. Este patrimônio genético

tem valor econômico estratégico inestimável em várias atividades, mas é no desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (LAPA *et al.*, 2003; CALIXTO, 2003).

As plantas brasileiras são consideradas altamente promissoras para obtenção de novos fármacos e medicamentos à base de extratos vegetais, mas são pouco conhecidas sob qualquer ponto de vista. Além disso, produtos a base de plantas estão sendo consumidos sem que sua eficácia e segurança tenham sido estudadas (BLUMENTHAL; GOLDBERG; BRINCKMANN, 2001). Um caso é o *Endopleura uchi*, uma planta nativa da região amazônica usada na medicina popular como antiinflamatório, método contraceptivo, e também contra infecções urinárias e miomas (CORRÊA, 1984). Este trabalho mostrou que o decocto das cascas do caule de *E. uchi* apresenta citotoxicidade a células de adenocarcinoma uterino humano (células HeLa). O decocto diminuiu a viabilidade e proliferação de células HeLa de maneira dose dependente. Além disso, os resultados obtidos neste trabalho indicaram que a morte celular provavelmente é causada pela apoptose de células HeLa pela via intrínseca. De nosso conhecimento, este é o primeiro relato científico que comprova o uso popular do decocto de *E. uchi* contra carcinomas uterinos.

Durante o preparo do chá, polissacarídeos também são extraídos conjuntamente com metabólitos secundários. Polissacarídeos obtidos de diversas fontes vegetais têm mostrado atividade antitumoral sobre diferentes tipos de câncer como câncer gástrico (XU *et al.*, 2011), câncer de mama (TAPER; ROBERFROID, 1999) e também sobre células de leucemia humana (WU; LEE, 2011).

Neste trabalho, foi isolada a partir do decocto das cascas do caule de *E. uchi* de uma arabinogalactana do tipo II. Até a realização deste trabalho, nenhum relato havia sido publicado sobre carboidratos de presentes em *E. uchi*. Esta arabinogalactana se mostrou capaz de diminuir a viabilidade de células HeLa, entretanto o efeito observado foi inferior ao do decocto. O polissacarídeo não foi capaz de induzir apoptose, indicando que a diminuição na viabilidade se deve a outro mecanismo.

Os polissacarídeos podem agir diretamente as células tumorais, mas também podem promover citotoxicidade através da mediação de macrófagos. Os polissacarídeos podem ativar macrófagos, os quais, quando ativados, são capazes de reconhecer, ligar e eliminar células tumorais (KLIMP *et al.*, 2002). Dessa forma o efeito da arabinogalactana isolada de *E. uchi* sobre macrófagos peritoneais também foi avaliado. O polissacarídeo foi capaz de ativar o *burst* respiratório de macrófagos peritoneais evidenciado pelo aumento na liberação de ânion superóxido. Além disso, análises morfológicas mostraram que macrófagos tratados com o polissacarídeo apresentam perfil de macrófagos ativados. A hipótese de que o polissacarídeo poderia promover a morte de células tumorais por ativação de macrófagos não pode ser descartada, contudo, este parametro não foi avaliado neste trabalho. O decocto de *E. uchi* também afetou de maneira similar macrófagos peritoneais, promovendo o *burst* respiratório.

Por fim, devido ao efeito citotóxico de *E. uchi* em células HeLa, este trabalho investigou os metabólitos secundários presentes nesta espécie. Diversos metabólitos de plantas são conhecidos por apresentarem atividade citotóxica. Alguns metabólitos isolados de plantas já são usados comumente no tratamento de pacientes com câncer, como por exemplo a camptotecina e o paclitaxel (BOIK, 2001). Este trabalho isolou uma fração a partir do extrato etanólico da precipitação do decocto das cascas de *E. uchi*, que provavelmente contém o composto ativo do decocto. Esta fração inibiu o crescimento de células HeLa em mais de 90% na concentração de 100 µg/ml. Estudos envolvendo os metabólitos desta espécie mostram-se bastante promissores, já que somente foi descrito a presença de um metabólito secundários (bergenina) das cascas do caule desta espécie.

5. CONCLUSÕES

- A partir do decocto das cascas do caule de *E. uchi* foi obtido um polissacarídeo bruto (AGb) a partir do qual, após purificações, foi isolada e caracterizado uma arabinogalactana do tipo II (AG);

- O decocto das cascas do caule de *E. uchi* (UX) apresenta atividade citotóxica a células HeLa, reduzindo a viabilidade celular e a proliferação celular. Já AGb e AG também diminuem a viabilidade e proliferação celular, mas de maneira mais discreta que UX;

- Os resultados sugerem que UX promove morte celular por apoptose pela via mitocondrial;

- UX, AGb e AG podem atuar como modificadores da resposta biológica;

- A investigação dos metabólitos secundários de *E. uchi* mostrou a extração de diversos compostos.

- O sobrenadante etanólico da precipitação dos polissacarídeos do decocto de *E. uchi* apresentou-se citotóxico a células CCRF-CEM. Após fracionamento, obteve-se uma fração que reduziu fortemente viabilidade de células HeLa, indicando que nesta fração se encontra o composto ativo do decocto de *E. uchi*.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J.S. *Immunologia celular e molecular*. 5. ed. Rio de Janeiro: *Elsevier*, 2005.

ABBOUYI, A. E.; TOUMI, M.; HACHIMI, Y.E.; JOSSANG, A. In vitro effects of aqueous seeds extract of *Acacia cyanophylla* on the opsonized zymozan-induced superoxide anions production by rat polymorphonuclear leukocytes. *Journal of ethnopharmacology*, v. 91, p. 159-165, 2012.

ADAMS, D. O. Macrophages. *Methods in Enzymology*, v. 58, p. 494–506, 1979.

ADAMS, G. A. Complete acid hydrolysis. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 5, p. 269-276, 1965.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochemical Journal*, v. 357, p. 593-615, 2001.

ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. *Cadernos temáticos de química Nova na Escola*, n. 3, p. 10-15, 2001.

AMORIM, J. C. Efeitos biomoduladores da pectina da casca dos frutos de cacau (*Theobroma cacao* L.) sobre macrófagos peritoneais de camundongos. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

APPAIX, F.; MINATCHY, M.N.; RIVA-LAVIELLE, C.; OLIVARES, J. ANTONSSON, B. SAKS, V.A. Rapid spectrophotometric method for quantitation of cytochrome c release from isolated mitochondria or permeabilized cells revisited. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1457, p. 175-181, 2000.

BENARBA, B.; MEDDAH, B.; AOUES, A. Bryonia dioica aqueous extract induces apoptosis through mitochondrial intrinsic pathway in BL41 Burkitt's lymphoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 141, p. 510-516, 2012.

BEUTLER, B. Innate Immunity: an overview. *Molecular Immunology*, v. 40, p.845–859, 2004.

BLUMENKRANTZ, N.; ASBOE-HANSEN, G. New method for quantitative determination of uronic acids. *Analytical Biochemistry*, v. 54 (2), p. 484-489, 1973.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. *Herbal Medicine – Expanded Commission and Monographs*. Austin: American Botanical Council, 2000.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, p. 907–916, 2001.

- BOHN, J. A.; BeMILLER, J. N. (1→3) β -d-glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers*, v. 28, p. 3–14, 1995.
- BOIK, J. C. *Natural compounds in cancer therapy: promising nontoxic antitumor agents from plants and other natural sources*. Princeton: Oregon Medical Press; 521 p., 2001.
- BOULET, J.C.; WILLIAMS, P.; DOCO, T. A Fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 69(1), p. 79–85, 2007
- BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, v. 161, p. 839–851, 2001.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRECKER, L.; WICKLEIN, D.; MOLL, H.; FUCHS, E.C.; BECKER, M.W.; PETERSEN, A. Structural and immunological properties of arabinogalactan polysaccharides from pollen of timothy grass (*Phelum pratense* L.). *Carbohydrate Research*, v. 340, p. 657-663, 2005.
- BRETT, C.; WALDRON, K. *Physiology and biochemistry of plant cell walls*. London: Unwin Hyman, 194 p. 1990.
- BRUMATTI, G.; SHERIDAN, C.; MARTIN, S.J. Expression and purification of recombinant annexin V for the detection of membrane alterations on apoptotic cells. *Methods*, v. 44, n. 3, p. 235-40, 2008.
- BURGALETA, C.; TERRITO, M. C.; QUAN, S. G.; GOLDE, D. W. Glucan activated macrophages: functional characteristics and surface morphology. *Journal of the Reticuloendothelial Society*, v. 23, p. 195–204, 1978.
- BURK, D.R.; SENECHAL-WILLIS, P.; LOPEZ, L.C.; HOGUE, B.G.; DASKALOVA, S.M. Suppression of lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW 264.7 murine macrophages by aqueous extract of *Clinopodium vulgare* L. (Lamiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 126, p. 397-405, 2009.
- BURKE, B.; LEWIS, C. E. *The Macrophage*. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2002.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1776, p. 86-107, 2007.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). *Plantas Medicinais sob a ótica da química moderna*. Chapecó: Editora Argos, p. 297-315, 2001.

CAO, W. L., X-Q.; LIU, L.; YANG, T-H.; LI, C.; FAN, H-T.; JIA, M.; LV, Z-G.; MEI, Q-B. . Structure of an anti-tumor polysaccharide from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. *Carbohydrate Polymers*, v. 66, p. 149-159, 2006.

CAO, W. L., XQ.; WANG, X.; FAN, HT.; ZHANG, XN.; HOU, Y.; LYU, SB E MEI, QB. . A novel polysaccharide, isolated from *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels induces the apoptosis of cervical cancer HeLa cells through an intrinsic apoptotic pathway. *Phytomedicine*, v. 17, p. 598-605, 2010.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *The Plant Journal*, v. 3, p. 1-30, 1993.

CARPITA, N.; McCANN, M. The cell wall. In: BUCHANAN, B. B.; GRUISSEM, W.; JONES, R.L. (Ed.). *Biochemistry and Molecular Biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, p. 52-108, 2000.

CARPITA, N. C.; SHEA, E. M. Linkage structure by gas chromatography mass spectrometry of partially-methylated alditol acetates. In: BIERMANN, C. J.; MCGINNIS, G. D. *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*, Florida, CRC Press, 1989.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.443-461. 2002.

CAVAILLON, J.M. Cytokines and macrophages. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 48, p.445-453, 1994.

CHEN, Q.; YANG, G. W.; AN, L. G. Apoptosis of hepatoma cells SMMC-7721 induced by Ginkgo biloba seed polysaccharide. *World Journal Gastroenterology*, v. 8 (5), p. 832-836, 2002.

CHINTALWAR, G.; JAIN, A.; SIPAHIMALANI, A.; BANERJI, A.; SUMARIWALLA, P.; RAMAKRISHNAH, R.; SAINIS, K. An immunologically active arabinogalactan from *Tinospora cordifolia*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 1089-1093, 1999.

CHOI, E. -M.; HWANG, J. -K. Enhancement of oxidative response and cytokine production by yam mucopolisaccharide in murine peritoneal macrophages. *Fitoterapia*, v. 73, p. 629-237, 2002.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M. A polysaccharide from a tea (infusion) of *Maytenus ilicifolia* leaves with anti-ulcer protective effects. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 1018-1021, 2006.

CIPRIANI, T. R.; MELLINGER, C. G.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H., FREITAS, C. S.; MARQUES, M. C. A.; GORIN, P. A. J.; SASSAKI, G. L. IACOMINI, M. Polygalacturonic acid: Another anti-ulcer polysaccharide from the medicinal plant *Maytenus ilicifolia*. *Carbohydrate Polymers*, v. 78, p.361-363, 2009.

CLASSEN, B.; THUDE, S.; BLASCHEK, W.; WACK, M.; BODINET, C. Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptista* and *Echinaceae*. *Phytomedicine*, v. 13, p. 688-694, 2006.

COHEN, S. M.; RYAN, L.; ROOT, K. The oxidative metabolism of thioglycollate-elicited mouse peritoneal macrophages: the relationship between oxygen, superoxide and hydrogen peroxide and the effect on monolayer formation. *Journal of Immunology*, v. 127, p. 1007–1011, 1981.

COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *Journal of Immunology*, v. 121, p. 813-816, 1978.

COMMINS, P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: cytokines, interferons, and chemokines. *Journal of Immunology*, v. 125, p. 53-72, 2010.

CORRÊA, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1984, v.6, 326p.

COSGROVE, D. J. Growth of the plant cell wall. *Reviews*, v. 6, p. 850-861, 2005.

COSTA, P. A.; BALLUS, C. A.; TEIXEIRA-FILHO, J., GODOY, H. T. Phytosterols and tocopherols content of pulps and nuts of Brazilian fruits. *Food Research International*, v. 43, p. 1603-1606, 2010.

COULTER, J. A.; MCCARTHY, H. O.; XIANG, J.; ROEDL, W.; WAGNER, E.; ROBSON, T.; HIRST, D. G. Nitric oxide - A novel therapeutic for cancer. *Nitric Oxide*, v. 19, p. 192-198, 2008.

CRAWFORD, R. M.; FINBLOOM, D. S.; CHARA, J.; PAUL, W. E.; MELTZER, M. S. B-cell stimulatory factor-1 (IL-4) activated macrophages for increased tumoricidal activity and expression of Ia antigens. *Journal of Immunology*, v. 139, p. 135-141, 1987.

CRUZ, M. E. S.; NOZAKI, M. H.; BATISTA, M. A. Plantas medicinais e alelopatia. *Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, v. 3(15), p. 28-34, 2000.

CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; MONCADA, S.; LIEW, F. Y. Phagocytosis and induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *Immunology*, v. 79, p. 408-411, 1993.

DARZYNKIEWICZ, Z.; TRAGANOS, F.; ZHAO, H.; HALICKA, H.D.; LI, J. Cytometry of DNA replication and RNA synthesis: Historical perspective and recent advances based on "click chemistry". *Cytometry A*, v. 79, n. 5, p. 328-37, May 2011.

DE MARTINO, L.; MARTINOT, J.L.S.; FRANCESCHELLI, S.; LEONE, A.; PIZZA, C.; DE FEO, V. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 107, p. 91-94, 2006.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; TISCHER, C. A.; IACOMINI, M. The freereducing oligosaccharides of angico branco (*Anadenanthera colubrina*) gum exudates: an aid for structural assignments in the heteropolysaccharides. *Carbohydrate Research*, v. 320, p. 167-175, 1999.

DETERS, A.; DAUER, A.; SCHNETZ, E.; FARTASCH, M. HENSEL, A. High molecular compounds (polysaccharides and proanthocyanidins) from *Hamamelis virginiana* bark: influence on human skin keratinocyte proliferation and differentiation and influence on irritated skin. *Phytochemistry*, v. 58, p. 949-958, 2001.

DEY, P. M.; BROWNLEADER, M. D.; HARBORNE, J.B. The plant, the cell and its molecular components. In: DEY, P.M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). *Plant Biochemistry*. Bristol: Academic Press, p. 6-9, 1997.

DUBOIS, M.; GILLES, A.; HAMILTON, J. K.; REBERS, P. A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, v. 28, n. 3, p. 350-356, 1956.

EBRINGEROVÁ, A.; KARDOSOVÁ, A.; HROMA'DKOVÁ, Z.; MALOVIKOVÁ, A.; HRÍBALOVÁ, V. Immunomodulatory activity of acidic xylans in relation to their structural and molecular properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 30, p. 1-6, 2002.

ELLIS, M.; EGELUND, J.; SCHULTZ, C.J.; BACIC, A. Arabinogalactan-Proteins: Key Regulators at the Cell Surface? *Plant Physiology*, v. 153 (2), p. 403-419, 2010.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, v. 35 (4), p. 495-516, 2007.

ER, H. M.; CHENG, E.H.; RADHAKRISHNAH, A.K. Anti-proliferative and mutagenic activities of aqueous and methanol extracts of leaves from *Pereskia bleo* (Kunth) DC (Cactaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 448-456, 2007.

ESCRIBANO, J.; RÍOS, I.; FERNÁNDEZ, J.A. Isolation and cytotoxic properties of a novel proteoglycan from corms of saffron plant (*Crocus sativus* L.). *Biochimica and Biophysica Acta*, v. 1426, p. 217-222, 1999.

ESTRADA, A.; YUN, C.H.; KESSEL, A. V.; LI, B.; HAUTA, S.; LAARVELD, B. Immunomodulatory activities of oat beta-glucan in vitro and in vivo. *Microbiology and Immunology*, v. 41(12), p. 991-998, 1997.

FADOK, V.A.; LASZLO, D.J.; NOBLE, P.W.; WEINSTEIN, L.; RICHES, D.W.H.; HENSON, P.M. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. *Journal of Immunology*, v. 151 (8), p. 4274-4285, 1993.

FAIRWEATHER, D.; CIHAKOVA, D. Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, v. 33, p. 222–230, 2009.

FARIAS, C.L.A. Xiloglucanas de sementes de *Copaifera langsdorffii* (COPAÍBA) e seu complexo com óxivanádio (IV/V): Efeitos sobre células de melanoma murino B16F10 *in vitro*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

FERREIRA, M. L. C. Polissacarídeos solúveis de folhas de *Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris*: Isolamento, caracterização e efeitos sobre células THP-1. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

FINCHER, G.B.; STONE, B.A; CLARKE, A.E. Arabinogalactan-Proteins: Structure, Biosynthesis, and Function. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 34 (1), p. 47-70, 1983.

FOLEY, G.E.; LAZARUS, H.; FARBER, S.; UZMAN, B.G.; BOONE, B.A.; McCARTHY, R.E. Continuous culture of human lymphoblasts from peripheral blood of a child with acute leukemia. *Cancer*, v. 18(4), p. 522-529, 1965.

GALLUZZI, L.; MAIURI, M. C.; VITALE, I.; ZLISCHKA, H.; CASTEDO, M.; ZITVOGEL, L.; KROEMER, G. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death and Differentiation*, v. 14, p. 1237–1243, 2007.

GAN, L.; WANG, J.; ZHANG, S. Inhibition the growth of human leukemia cells by *Lycium barbarum* polysaccharide. *Wei Sheng Yan Jiu*, v. 30(6), p. 333-335, 2001.

GANE, A.M.; CRAIK, D.; MUNRO, S.L.A.; HOWLETT, G. J.; CLARKE, A.E.; BACIC, A. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*. *Carbohydrate Research*, v. 277, p. 67–85, 1995

GASPAR, Y.; JOHNSON, K.L.; MCKENNA, J.A.; BACIC, A.; SCHULTZ, C.J. The complex structures of arabinogalactan-proteins and the journey towards understanding function. *Plant Molecular Biology*, v. 47, p. 161–176, 2001.

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in ¹³C magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 53, p. 1212-1222, 1975.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R.. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131–138, 1982.

HACKETT, C. J. Inate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy: Prospects and research challenges. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 112, n. 4, p. 686-694, 2003.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press, 936 p., 1999.

HAN, S. B.; KIM, Y. H.; LEE, C. W.; PARK, S. M.; LEE, H. Y.; AHN, K. S.; KIM, I. - H.; KIM, H. M. Characteristic immunostimulation by angelan isolated from *Angelica gigas* Nakai. *Immunopharmacology*, v. 40, p. 39-48, 1998.

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.651-666. 2002.

HILLESTAD, A.; WOLD, J.K.; ENGEN, T. Water-soluble glycoproteins from *Cannabis sativa* (Thailand). *Phytochemistry*, v. 16(12), p. 1953-1956, 1977.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumor activity. *Phytoterapy Research*, v. 13, p. 380-387, 1999.

HUNG, C. F.; HSU, B. Y.; CHANG, S. C.; CHEN, B. H. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from *Zizyphus jujuba*. *Nutrition*, v. 28, p. 98-105, 2012.

JONES, J. K. N.; STOODLEY, R. J. Fractionation using copper complexes. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 5, p. 36-38, 1965.

KAČURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVÁ, V.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, N. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, v. 43(2), p. 195-203, 2000.

KANEDA, M.; RENSING, K.; SAMUELS, L. Cell Wall Deposition in Developing Secondary Xylem of Poplar. *Journal of Integrative Plant Biology*, v. 52, p. 234-243, 2010.

KARDOSOVÁ, A.; EBRINGEROVÁ, A.; ALFOLDI, J.; NOSÁL'OVÁ, G.; MATÁKOVÁ, T.; HRÍBALOVÁ, V. Structural features and biological activity of an acidic polysaccharide complex from *Mahonia aquifolium* (Pursh) Nutt. *Carbohydrate Polymers*, v. 57, p. 165-176, 2004.

KARNOVSKI, M.L.; LAZDINS, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. *Journal of Immunology*, v. 121 (3), p. 809-813, 1978.

KAWASE, I.; KOMUTA, K.; OGURA, T.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T.; KISHIMOTO, S. Murine tumor cell lysis by antibody-dependent macrophage mediated cytotoxicity using syngeneic monoclonal antibodies. *Cancer Research*, v. 45, 1985.

KISCHKEL, F. C.; HELLBARDT, S.; BEHRMANN, I. Cytotoxicity dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *The EMBO Journal*, v. 14, p. 5579-5588, 1995.

KLEBANOFF, S. J. *Oxygen metabolites from phagocytes. In: Inflammation – Basic Principles and Clinical Correlates*. [S.l.]: Raven Press, 1992.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada*, V. 30(3), p. 241-248, 2009.

KLEINERT, H.; SCWARZ, P. M.; FORSTERMANN, U. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *European Journal of Pharmacology*, v. 500, p. 255–266, 2004.

KLIMP, A. H.; VRIES, E. G. E.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 44, p. 143–16, 2002.

KLIONSKY, D. J.; CUERVO, A. M.; SEGLEN, P. O. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy*, v. 3, p. 181–206, 2007.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr. Drug. Targets. Inflammation & Allergy - Drug Targets*, v. 4, p. 471–479, 2005.

KRIFA, M.; BOUHLEL, I.; GHEDIRA-CHEKIR, L.; GHEDIRA, K. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of an aqueous extract of *Limoniastrum guyonianum* gall. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 146, p. 243-249, 2013.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death and Differentiation*, v. 16 (1), p. 3-11, 2009.

KUENG, W.; SILBER, E.; EPPENBERGER, U. Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Analytical Biochemistry*, v. 182, p. 16-19, 1989.

KUROSAKA, K.; TAKAHASHI, M.; WATANABE, N. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *The Journal of Immunology*, v. 71 (9), p. 4672-4679, 2003.

KVERNHEIM, A.L. Methylation analysis of polysaccharides with butyllithium in dimethyl sulfoxide. *Acta Chemica Scandinavica*, v. 41, p. 150-152, 1987.

LAPA, A.J.; CADEN, S.; LANDMAN, M.T.R.L.; CASTRO, M.S.A.; LIMA, T.C. *Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais*. v.1, 5 p., 2003.

LECHNER, M.; LIRK, P.; RIEDER, J. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) in tumor biology: the two sides of the same coin. *Seminars in Cancer Biology*, v. 15, p.277-289, 2005.

LEE, K. J. D.; SAKATA, Y.; MAU, S. L.; PETTOLINO, F.; BACIC, A.; QUATRANO, R. S.; KNIGHT, C. D.; KNOX, J. P. Arabinogalactans proteins are required for apical cell extension in the moss *Physcomitrella patens*. *The plant cell*, v. 17, p. 3051-3065, 2005.

LEROUXEL, O.; CAVALIER, D. M.; LIEPMAN, A. H.; KEEGSTRA, K. Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides — a complex process. *Plant Biology*, v. 9, p. 621–630, 2006.

LEUNG, M. Y. K.; LIU, C.; ZHU, L. F.; HUI, Y. Z.; YU, B.; FUNG, K. P. Chemical and biological characterization of a polysaccharide biological response modifier from *Aloe vera* L. var. *chinensis* (Haw.) Berg.. *Glycobiology*, v. 14 (6), p. 501-510, 2004.

LI, Y. N., Y.; WU, H.; SUN, Y.; LI, Q.; KONG, X.; LIU, L.; MEI, Q. Modified Apple Polysaccharides Could Induce Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Journal Food Science*, v. 75, n. 8, 2010.

LOGUE, S. E. E., M.; MARTIN, S. Annexin V has been widely used for the detection of apoptotic cells in vivo as well as in vitro. *Nature Protocols*, v. 4(9), p. 1383-1395, 2009.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil Volume 2. *Plantarum*, São Paulo, p. 155, 2002.

LUETTIG, B.; STEINMULLER, C.; GIFFORD, G. E.; WAGNER, H. Macrophage activation by the polysaccharide arabinogalactan isolated from plant cell cultures of *Echinacea purpurea*. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 81 (9), p. 669-675, 1989.

MACMICKING, J.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annual Review of Immunology*, v. 15, p. 323-350, 1997.

MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARINHO, H. A.; FERREIRA, A. G. Identificação de bergenina e carotenóides no fruto de uchi (*Endopleura uchi*, Humiriaceae). *Acta Amazonica*, v. 37(3), p. 447-450, 2007.

MAKKAR, H.P.S.; SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. *Plant Secondary Metabolites*. New Jersey: Humana Press, 2007.

MARCINKIEWICZ, J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. *Immunopharmacology*, v. 37, p. 35-41, 1997

MARCOLINO, M.M.K. Avaliação de atividade leishmanicida in vitro de heteropolissacarídeos ácidos: não sulfatados e sulfatados naturalmente. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S. Studies of edible Amazonian plants. Part 5: Chemical characterization of Amazonian *Endopleura uchi* fruits. *European Food Research and Technology*, v. 214, p. 331-334, 2002.

MATSUBARA, S. *Polifenóis em chás comercializados no Brasil*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos – Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2001.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. *Trends in Biochemistry Science.*, v. 22, p. 477-481, 1997.

MELLINGER, C. G.; CARBONERO, E. R.; NOLETO, G. R.; CIPRIANI, T. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and biological properties of an arabinogalactan from *Phyllanthus niruri*. *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 1479–1483, 2005.

MELLINGER, C. G.; CIPRIANI, T. R.; NOLETO, G. R.; CARBONERO, E. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 43, p. 115–120, 2008.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology and Pharmacology. *Pharmacological Reviews.*, v. 43, p. 109-142, 1994.

MORETÃO, M. P.; BUCHI, D. F.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Effect of an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco) on peritoneal macrophage functions. *Immunology Letters*, v. 89, p. 175–185, 2003.

MORETÃO, M. P.; ZAMPRONIO, A. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). *Immunology Letters*, v. 93, p. 189–197, 2004.

NASEEM, K. M. The role of nitric oxide in cardiovascular diseases. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 26, p. 33–65, 2005.

NASCIMENTO, A. M. Polissacarídeos e metabólitos secundários de *Spilanthes oleracea* L. (jambu). Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

NATHAN, C.F. Regulation of macrophages oxidative metabolism and antiparasitic activity. In: van FURTH, R. *Mononuclear phagocytes. Characteristics, physiology and function*. Boston: Martinus Nijhoff, p. 411-420, 1985.

NAWAB, A.; YUNUS, M.; MAHDI, A.A.; GUPTA, S. Evaluation of anticancer properties of medicinal plants from the Indian sub-continent. *Molecular and Cellular Pharmacology*, v. 3(1), p. 21-29, 2011.

NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O.; MERCÊ, A. L. R.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S. C.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M. Two galactomannan preparations from seeds from *Mimosa scabrella* (bracatinga): Complexation with oxovanadium (IV/V) and cytotoxicity on HeLa cells. *Journal of Inorganic Chemistry*, v. 103 (5), p. 749-757, 2009.

NORBURY, C.; NURSE, P. Animal cell cycles and their control. *Annual Reviews in Biochemistry*, v. 61, p. 441-470, 1992.

NUDO, L. P.; CATAP, E. S. Immunostimulatory effects of *Uncaria perrottetti* (A. Rich.) Merr. (Rubiaceae) vinebark aqueous extract in Balb/C mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 133(2), p. 613-620, 2011.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; SILVA, S. L.; NUNOMURA, S. M. Characterization of bergenin in *Endopleura uchi* bark and its anti-inflammatory activity. *Journal of Brazilian Chemistry Society*, v. 20(6), p. 1060-1064, 2009.

ORTEGA, A.; CARRETERO, J.; OBRADOR, E.; ESTRELA, J. M. Tumoricidal activity of endothelium-derived NO and the survival of metastatic cells with high GSH and Bcl-2 levels. *Nitric Oxide*, v. 19, p. 107–114, 2008.

PAULY, M.; FREIS, O.; PAULY, G. Galactomannan and xyloglucan: Bio-active polysaccharides. *Altured's Cosmetics & Toiletries*, v. 114, p. 65-78, 1999.

PELLERIN, P.; WATERS, E.; BRILLOUET, J.-M. Characterization of two arabinogalactan-proteins from red wine. *Carbohydrate Polymers*, v. 22(3), p. 187-192, 1993.

PEREIRA NETTO, A. B.; PETTOLINO, F.; SILVA, C. T. A. C.; SIMAS, F. F.; BACIC, A.; LEÃO, A. M. A. C.; IACOMINI, M.; MAURER, J. B. B. Cashew-Nut Tree Exudate Gum: identification of an arabinogalactan-protein as a constituent of the gum and use on the stimulation of somatic embryogenesis. *Plant Science*, v. 173, p. 468-477, 2007.

PERES, L.E.P. Metabolismo secundário. *Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz*, p.1-26. 2004.

QIN, X.; YAMAUCHI, R. AIZAWA, K.; INAKUMA, T.; KATOA, K. Structural features of arabinogalactan–proteins from the fruit of *Lycium chinense* Mill. *Carbohydrate Research*, v. 333, p. 79–85, 2001.

RAMESH, H. P.; YAMAKI, K.; TSUHIDA, T. Effect of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) galactomannan fractions on phagocytosis in rat macrophages and on proliferation and IgM secretion in HB4C5 cells. *Carbohydrate Polymers*, v. 50, p. 79-83, 2002.

REDGWELL, R.J.; CURTI, D.; WANG, J.; DOBRUCHOWSKA, J.M.; GERWIG, G.J.; KAMERLING, J.P.; BUCHELI, P. Cell wall polysaccharides of Chinese Wolfberry (*Lycium barbarum*): Part 2. Characterisation of arabinogalactan-proteins. *Carbohydrate Polymers*, v. 84(3), p. 1075–1083, 2011.

REID, J. S. G. Carbohydrate metabolism: structural carbohydrates. In: DEY, P. M.; HARBORNE, J. B. (Eds.). *Plant Biochemistry*. Bristol: Academic Press, p. 205-236, 1997.

REIDER, A.; GRIMMER, S.; KOLSET, S.O.; MICHAELSEN, T.E.; KNUTSEN, T.E. Cereal β -glucan preparations of different weight average molecular weights induce variable cytokine secretion in human intestinal epithelial cell lines. *Food chemistry*, 128, p. 1037-1043, 2011.

REILLY, T.P.; BELLEVUE, F.H.; WOSTER, P.M.; SVENSSON, C.K. Comparison of the in Vitro Cytotoxicity of Hydroxylamine Metabolites of Sulfamethoxazole and Dapsone. *Biochemical Pharmacology*, v. 55, p. 803-810, 1998.

REVILLA, J. *Plantas da Amazônia. Oportunidades Econômicas Sustentáveis*. Manaus: INPA/SEBRAE, 2001, p. 89-90.

RODRIGUES, E. Plants of restricted use indicated by three culture in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilomba). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 295-302, 2007.

ROSÁRIO, M. M. T.; KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; AMARAL, A. E.; NOLETO, G. R.; PETKOWICZ, C. L. O. Storage xyloglucans: potent macrophages activators. *Chemico-Biological Interactions*, v. 189, p. 127–133, 2011.

ROSÁRIO, M. M. T.; NOLETO, G. R.; BENTO, J. F.; REICHER, F.; OLIVEIRA, M. B. M.; PETKOWICZ, C. L. O. Effect of storage xyloglucans on peritoneal macrophages. *Phytochemistry*, v. 69, p. 464–472, 2008.

ROTROSEN, D. The respiratory burst oxidase in inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. *Raven Press*, p. 589-601, 1992.

SAMPEDRO, M. C.; ARTOLA, R. L.; MURATURE, M.; MURATURE, D.; DITAMO, Y.; ROTH, G. A.; KIVATINITZ, S. Mannan from *Aloe saponaria* inhibits tumoral cell line activation and proliferation. *International Immunopharmacology*, v. 4, p. 411-418, 2004.

SANDHU, A. P. S.; RANDHAWA, G. S.; DHUGGA, K. S. Plant cell wall matrix polysaccharide biosynthesis. *Molecular Plant*, v. 2, p. 840-850, 2009.

SANTOS, R.I. Metabolismo Básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 4ªed. Porto Alegre/Florianópolis. Editora da Universidade, p.333-365. 2002.

SASADA, M.; PABST, M.; JOHNSTON, R. Activation of peritoneal macrophages by lypopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing

NADPH oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 258, n. 16, p. 9631–9635, 1983.

SCHEPETKINS, I. A.; FAULKNER, C.L.; NELSON-OVERTON, L.K.; WILEY, J.A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. *International Immunopharmacology*, v. 5, p.1783–1799, 2005.

SCHEPETKINS, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. *International Immunopharmacology*, v.6, p.317-333, 2006.

SCHULTES, R. E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes. XXI. Interesting native uses of the Humiriaceae in the northwest Amazon. *Journal of Ethnopharmacology*, v.1(1), p. 89-94, 1979.

SHANLEY, P.; LUZ, L.; SWINGLAND, I. R. The faint promise of a distant market: a survey of Belem's trade in non-timber forest products. *Biodiversity and Conservation*, v. 11, p. 615-636, 2002.

SHAW, G.M.; LEVY, P.C.; LOBUGLIO, A.F. Human monocyte cytotoxicity to tumor cells. I. Antibody-dependent cytotoxicity. *Journal of Immunology*, v. 121, p. 573-578, 1978.

SHOWALTER, A.M. Structure and function of plant cell wall proteins. *The Plant Cell*, v. 5 (1), p. 9-23, 1993.

SILVA, S. L.; OLIVEIRA, V. G.; YANO, T.; NUNOMURA, R. C. S. Antimicrobial activity of bergenin from *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. *Acta Amazonica*, v.39(1), p. 187-192, 2009.

SILVEIRA, J. *Avaliação dos Efeitos Immunomoduladores e Citotóxicos de Polissacarídeos de Chorisia speciosa e Hymeneae courbaril*. Trabalho de Dissertação de Mestrado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

SKLOOT, R. *HeLa: The Immortal Life of Henrietta Lacks*, Nova Iorque: Random House, 2007.

SONG, J. -Y.; HAN, S. -K.; SON, E. -H.; PYO, S. -N.; YUN, Y. -S.; YI, S. -Y. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. *International Immunopharmacology*, v. 2, p. 857-865, 2002.

SONODA, Y.; KASAHARA, T.; MUKAIDA, N.; SHIMIZU, N.; TOMODA, M.; TAKEDA, T. Stimulation of interleukin-8 production by acidic polysaccharides from the root of *Panax ginseng*. *Immunopharmacology*, v. 38, p. 287-294, 1998.

SRIVASTAVA, R.; KULSHRESHTHA, D. Bioactive polysaccharides from plants. *Phytochemistry*, v. 28 (11), p. 2877-2883, 1989.

STEPHEN, A. M. Other plant polysaccharides. In: ASPINALL, G. O. *The Polysaccharides*. Orlando: Academic Press, 1983. p. 97-193.

STIMPEL, M.; PROKSCH, A.; WAGNER, H.; LOHMANN-MATTHES, M. -L. Macrophage activation and induction of macrophage cytotoxicity by purified polysaccharides fractions from the plant *Echinacea purpurea*. *Infection and Immunity*, v. 46 (3), p. 845-849, 1984.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*. 3.ed. Porto Alegre, Artmed, 2004.

TAPER, H.S.; ROBERFROID, M. Influence of inulin and oligofructose on breast cancer and tumor growth. *The Journal of Nutrition*, v. 129(7), p. 1488-1491, 1999.

TAYLOR, R. L; CONRAD, H. E. Stoichiometric depolymerization of polyuronides and glycosaminoglycuronans to monosaccharides following reduction of their carbodiimide-activated carboxyl groups. *Biochemistry*, v. 11(8), p. 1383-1389, 1972.

TAYLOR, P. R.; MARTINEZ-POMAREZ, L.; STACEY, M.; LIN, H. H.; BROWN, G.D.; GORDON, S. Macrophage receptors and immune recognition. *Annual Reviews in Immunology*, v. 23, p. 901-944, 2005.

THUDE, S.; CLASSEN, B. High molecular weight constituents from roots of *Echinacea pallida*: An arabinogalactan-protein and an arabinan. *Phytochemistry*, v. 66, p. 1026-1032, 2005.

TINARI, A.; GIAMMARIOLI, A. M.; MANGANELLI, V.; CIARLO, L.; MALORNI, W. Analyzing morphological and ultrastructural features in cell death. *Methods in Enzymology*, v. 442, p. 1-26, 2008.

TZIANABOS, A. O. Polysaccharide immunomodulators as therapeutic agents: structural aspects and biologic function. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 13 (4), p. 523-533, 2000.

WAGNER, H; BLADT, S. *Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas*. 2nd edition. Academic Press, 1996.

WAGNER, H.; STUPPNER, H.; SCHAFER, W.; ZENK, M. Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. *Phytochemistry*, v. 27, p. 119-126, 1988.

WANG, X.S.; FANG, J.N. Immunological activities and structure of pectin from *Centella asiatica*. *Carbohydrate Polymers*, v. 60, p. 95-101, 2005.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Acetylation. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 211-215, 1963b.

WOLFROM, M. L.; THOMPSON, A. Reduction with sodium borohydride. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, v. 2, p. 65-68, 1963a.

WU, S.-C.; LEE, B.-H. Buckwheat polysaccharide exerts antiproliferative effects in THP-1 human leukemia cells by inducing differentiation. *Journal of Medicinal Food*, v. 14, p. 26–33, 2011.

WU, X. M., G.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; LIANG, L.; YANG, L. Isolation, purification and in vitro anti-tumor activity of polysaccharide from *Ginkgo biloba* sarcotesta. *Carbohydrate Polymers*, v. 86, p. 1073-1076, 2011.

VAYSSADE, M.; SENGKHAMPARN, N.; VERHOEF, R.; DELAIGUE, C.; GOUNDIAM, O.; VIGNERON, P.; VORAGEN, A. G.; SCHOLS, H. A.; NAGEL, M. Antiproliferative and proapoptotic actions of okra pectin on B16F10 melanoma cells. *Phytotherapy Research*, v. 24, n. 7, p. 982-9, 2010.

YAMADA, H.; KOMIYAMA, K.; KIYOHARA, H.; CYONG, J.-C.; HIRAKAWA, Y.; OTSUKA, Y. Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharide from roots of *Angelica acutiloba*. *Planta Medica*, v. 56, p. 182-186, 1990.

YANG, X.; ZHAO, Y.; WANG, H.; MEI, Q. Macrophage activation by an acidic polysaccharide isolated from *Angelica Sinensis* (Oliv.) Diels. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 40(5), p. 636-643, 2007.

YARIV, J.; RAPPORT, M.M.; GRAF, L. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. *Biochemical Journal*, v.85, p.383, 1962.

YUN, C.H.; ESTRADA, A.; KESSEL, A.V.; PARK, B.C.; LAARVELD, B. β -Glucan, extracted from oat, enhances disease resistant against bacterial and parasitic infections. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35, p. 67-75, 2003.

ZHANG, M.; CHEN, H.; HUANG, J.; LI, Z.; ZHU, C.; ZHANG, S. Effect of *Lycium barbarum* polysaccharide on human hepatoma QGY7703 cells: inhibition of proliferation and induction of apoptosis. *Life Sciences*, v. 76(18), p. 2115-2124, 2005.

ZHU, H.; DI, H.; ZHANG, Y.; ZHANG, J.; CHEN, D. A protein-bound polysaccharide from the stem bark of *Eucommia ulmoides* and its anti-complementary effects. *Carbohydrate Research*, v. 344, p. 1319-1324, 2009.

ZIPPEL, J.; DETERS, A.; HENSEL, A. Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: Specific

enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 124, p. 391-296, 2009.

ZIPPEL, J.; WELLS, T.; HENSEL, A. Arabinogalactan protein from *Jatropha curcas* L. seeds as TGF β 1-mediated inducer of keratinocyte in vitro differentiation and stimulation of GM-CSF, HGF, KGF and in organotypic skin equivalents. *Fitoterapia*, v. 81, 772–778, 2010.